

**Einfluss
nichtsteroidaler Antirheumatika (NSAR)
auf die Proteinexpression
von Neuroblastomzellen**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Detlef Fründ

aus Bad Oeynhausen

Marburg/Lahn 2006

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation
am 14. November 2006 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. K. Kuschinsky

Zweitgutachter: Prof. Dr. R. M. Nüsing

Tag der mündlichen Prüfung am: 15. November 2006

Meiner Anja

Inhalte

1.	Einleitung	1
1.1.	Das Neuroblastom	1
1.1.1.	Überblick	1
1.1.2.	Stadieneinteilung des Neuroblastoms	2
1.1.3.	Molekulargenetische Parameter des Neuroblastoms	3
1.1.3.1.	Amplifikation und Expression des N-Myc-Gens	3
1.1.3.2.	Chromosom-1p-Deletion	4
1.1.3.3.	Hyperploidie	4
1.1.4.	Therapie des Neuroblastoms	4
1.2.	Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR)	7
1.2.1.	Charakteristischer Wirkmechanismus	7
1.2.2.	Einfluss von NSAR auf die Tumorgenese und Apoptose	11
1.2.2.1.	Untersuchungen mit Tier-Modellen	11
1.2.2.2.	Epidemiologische Studien	12
1.2.2.3.	Randomisierte Studien	13
1.2.2.4.	Mechanistische Untersuchungen der Wirkung von NSAR auf die Apoptose	14
1.2.2.5.	Mechanistische Untersuchungen der Wirkung von NSAR auf die Angiogenese	19
1.3.	Proteomforschung	21
1.3.1.	Definition "Proteom"	21
1.3.2.	Vom Genom zum Proteom	21
1.3.3.	Die Proteomanalyse	24
1.4.	Zielsetzung	29
2.	Material und Methoden	30
2.1.	Zellkultur	30
2.1.1.	Zelllinie	30
2.1.2.	Materialien und Chemikalien	30
2.1.3.	Umsetzen von Zellen	32
2.1.4.	Bestimmung der Zellzahl	33
2.1.4.1.	Zählkammer nach Neubauer	33
2.1.5.	Wirkstoff- und Kontrolllösungen für die Behandlung der Zellen	34
2.1.6.	Zellstimulation mit Wirkstoff zur Untersuchung der Proteinexpression	35
2.1.7.	Ernten von Zellen	35

2.2.	MTT-Test	37
2.2.1.	Überblick	37
2.2.2.	Materialien und Chemikalien	37
2.2.3.	Durchführung des MTT-Tests	38
2.3.	Apoptose-Test durch Acridinorange-/ Ethidiumbromidfärbung	39
2.3.1.	Überblick	39
2.3.2.	Materialien und Chemikalien	39
2.3.3.	Durchführung des Acridinorange/Ethidiumbromid-Apoptose-Tests	40
2.4.	FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorting) des DNA-Gehalts von Zellen	42
2.4.1.	Allgemeines	42
2.4.2.	Probenvorbereitung für die FACS-Analyse	44
2.4.2.1.	Materialien und Chemikalien	44
2.4.2.2.	Durchführung der Probenvorbereitung	45
2.4.3.	Messungen der Zellproben und ihre Auswertung	46
2.4.3.1.	Materialien und Chemikalien	47
2.4.3.2.	Durchführung der FACS-Analyse	47
2.5.	Quantitative Bestimmung von Prostanoiden	48
2.6.	Quantitative Bestimmung von Proteinen	49
2.6.1.	Überblick	49
2.6.2.	Materialien und Chemikalien	50
2.6.3.	Proteinbestimmung nach Bradford	50
2.6.3.1.	Herstellung des Proteinstandards	50
2.6.3.2.	Durchführung der Proteinbestimmung	51
2.7.	Zweidimensionale Elektrophorese in der Proteomforschung	53
2.7.1.	Allgemeine Grundlagen	53
2.7.2.	Probenvorbereitung	54
2.7.2.1.	Materialien und Chemikalien	56
2.7.2.2.	Durchführung der Probenvorbereitung	56
2.7.3.	Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)	57
2.7.3.1.	Materialien und Chemikalien	59
2.7.3.2.	Durchführung der Rehydratisierung	60
2.7.3.3.	Durchführung der isoelektrischen Fokussierung (IEF)	61
2.7.4.	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2. Dimension)	62
2.7.4.1.	Materialien und Chemikalien	63
2.7.4.2.	Vorbereitung der Elektrophorese-Kammer	64
2.7.4.3.	Equilibrierung der IPG-Gele	64
2.7.4.4.	Vorbereitung der Gele für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	64
2.7.4.5.	Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2. Dimension)	65

2.7.5.	Färbung der Polyacrylamidgele	66
2.7.5.1.	Färbung mit Coomassie Brilliantblau-Farbstoffen	66
2.7.5.2.	Materialien und Chemikalien	67
2.7.5.3.	Durchführung der Färbung mit kolloidalem Coomassie Brilliantblau G-250	67
2.7.5.4.	Färbung durch Reduktion von Silber-Ionen	68
2.7.5.5.	Materialien und Chemikalien	69
2.7.5.6.	Durchführung der Silberfärbung	69
2.7.6.	Computergestützte Bildanalyse	70
2.7.6.1.	Durchführung der computergestützten Bildanalyse	71
2.8.	Protein-Identifikation durch Massenspektrometrie und Datenbankrecherchen	74
2.8.1.	Überblick	74
2.8.2.	Prinzipien der Massenspektrometrie	74
2.8.3.	Vergleich von MS-Daten mit Daten aus Protein-Datenbanken	76
2.8.4.	Durchführung des Proteinverdau, der massenspektrometrischen Analyse und der Datenbank-Recherche	77
2.9.	RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction)	78
2.9.1.	Überblick	78
2.9.2.	Isolierung von Gesamt-RNA aus Monolayer-Zellen	79
2.9.2.1.	Materialien und Chemikalien	79
2.9.2.2.	Durchführung der RNA-Isolierung	80
2.9.3.	Quantifizierung der isolierten RNA	81
2.9.3.1.	Materialien und Chemikalien	82
2.9.3.2.	Durchführung der RNA-Quantifizierung	82
2.9.4.	DNase-Verdau	82
2.9.4.1.	Materialien und Chemikalien	83
2.9.4.2.	Durchführung des DNase-Verdau	83
2.9.5.	Synthese von cDNA aus mRNA mithilfe der Reversen Transkriptase (Reverse Transkription)	83
2.9.5.1.	Materialien und Chemikalien	84
2.9.5.2.	Durchführung der Reversen Transkription	85
2.9.6.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	85
2.9.6.1.	Materialien und Chemikalien	86
2.9.6.2.	Durchführung der Polymerasekettenreaktion (PCR)	88
2.9.7.	Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte	89
2.9.7.1.	Materialien und Chemikalien	90
2.9.7.2.	Durchführung der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte	91
2.9.8.	Detektion und Auswertung der aufgetrennten PCR-Produkte	92
2.9.8.1.	Materialien	92
2.9.8.2.	Durchführung der Detektion und Auswertung der aufgetrennten PCR-Produkte	92
2.10.	Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	94
2.10.1.	Überblick	94

2.10.2. Materialien und Chemikalien	95
2.10.3. Durchführung der SDS-PAGE nach Laemmli	97
2.10.3.1. Gelzusammensetzung	97
2.10.3.2. Herstellung von Trenn- und Sammelgel	97
2.10.3.3. Probenvorbereitung	98
2.10.3.4. Auftrennung der Proteine durch Elektrophorese	98
2.11. Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose-Membranen (Western-Blotting)	99
2.11.1. Überblick	99
2.11.2. Materialien und Chemikalien	100
2.11.3. Durchführung des Western-Blots nach dem SemiDry-Verfahren	101
2.12. Nachweis von Proteinen auf Blot-Membranen durch immunochemische Detektion mit dem ECL-System	102
2.12.1. Überblick	102
2.12.2. Materialien und Chemikalien	104
2.12.3. Durchführung der immunochemischen Detektion	106
2.13. Statistik	107
3. Ergebnisse	108
3.1. Vitalitätsänderungen der Neuroblastom-Zelllinie KELLY unter dem Einfluss verschiedener NSAR	108
3.2. Morphologische Veränderungen unter Einfluss von Flufenaminsäure	110
3.3. Apoptotische Prozesse unter dem Einfluss von Flufenaminsäure	116
3.3.1. Acridinorange-/ Ethidiumbromid-Färbung	116
3.3.2. FACS-Analyse des DNA-Gehalts mit Propidiumjodid	119
3.4. Untersuchungen der Transkription der Cyclooxygenasen	127
3.5. Hemmung der Prostanoid-Synthese unter Einfluss von Flufenaminsäure	128
3.6. Änderungen des Proteinmusters von Neuroblastomzellen nach Behandlung mit Flufenaminsäure	131
3.6.1. Regulierte Proteine im Überblick	131
3.6.2. Bei der differentiellen Proteomanalyse hoch regulierte Proteine	134
3.6.2.1. Heat shock protein 75 (Hsp75)	134
3.6.2.2. p47 (Co-Faktor von p97)	138
3.6.2.3. Laminin-bindendes Protein (Lbp)	143
3.6.2.4. Cytosolische Malat-Dehydrogenase (MDH1)	145
3.6.2.5. Ribosomales Protein P0 (RbP0)	147
3.6.2.6. Dihydrolipoamid-Acetyltransferase, Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit E2 (PDC-E2)	149

3.6.3.	Bei der differentiellen Proteomanalyse herunter regulierte Proteine	151
3.6.3.1.	Heat shock cognate protein 70/54 (Hsc70/54)	151
3.6.3.2.	Enolase-1, alpha (Eno-1)	158
3.6.3.3.	T-Complex protein 1, epsilon (TCP-1e)	162
3.6.3.4.	Pyruvat-Kinase, Isoform M1 oder M2 (PK-M1/M2)	164
3.6.3.5.	Eukaryotischer Elongationsfaktor 2 (eEF2)	167
3.6.3.6.	Similar to Elongation factor 2b (sEF2b)	171
4.	Diskussion	174
4.1.	Wirkung von nichtsteroidalen Antirheumatika auf Zellen der Neuroblastom-Zelllinie KELLY	174
4.2.	Durch Behandlung von Neuroblastomzellen mit Flufenaminsäure regulierte Proteine	177
4.2.1.	Regulation von Hsp75/TRAP1	178
4.2.2.	Regulation des p97-Co-Faktors p47	182
4.2.3.	Regulation des Laminin-bindenden Proteins (Lbp)	184
4.2.4.	Regulation der cytosolischen Malat-Dehydrogenase (MDH1)	185
4.2.5.	Regulation des ribosomalen Proteins P0 (RbP0)	187
4.2.6.	Regulation von Dihydrolipoamid-Acetyltransferase, Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit E2 (PDC-E2)	188
4.2.7.	Regulation von Hsc70/54	189
4.2.8.	Regulation von Enolase-1, alpha (Eno-1)	193
4.2.9.	Regulation von TCP-1e (T-complex protein 1, epsilon)	196
4.2.10.	Regulation der Pyruvat-Kinase, Isoform M1 oder M2 (PK-M1/M2)	197
4.2.11.	Regulation des eukaryotischen Elongationsfaktors 2 (eEF2)	199
4.2.12.	Regulation von sEF2b (similar to elongation factor 2b)	201
5.	Zusammenfassung	202
6.	Abkürzungsverzeichnis	204
7.	Literaturverzeichnis	210
	Tagungsbeiträge und Publikation	241
	Lebenslauf	242
	Danksagungen	243

1. Einleitung

1.1. Das Neuroblastom

1.1.1. Überblick

Das Neuroblastom, ein typischer Tumor des Kleinkindes, ist mit 8 % aller kindlichen Krebserkrankungen der dritthäufigste Tumor im Kindesalter. In Deutschland werden jährlich ca. 100 – 120 neue Fälle diagnostiziert. Die Inzidenz des Neuroblastoms beläuft sich auf etwa zehn bis elf Neuerkrankungen pro 1.000.000 Kinder bis zum 15. Lebensjahr. Eine Geschlechtsdifferenz ist dabei nicht auszumachen.

Erstmals beschrieben wurde ein Neuroblastom 1864 von R. Virchow (Virchow R, 1864). Die erste erfolgreiche Entfernung bei einem elf Monate alten Kind wurde bereits 1917 von E. P. Lehmann veröffentlicht (Lehmann EP, 1917). Zur Behandlung des Neuroblastoms wurden zunächst relativ aggressive chirurgische und radiotherapeutische Maßnahmen ergriffen, während die Chemotherapie erst in den fünfziger und sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts von S. Farber et al. und W. G. Thurman et al. eingeführt wurde (Farber S, Toch R, 1951; Thurman WG, et al., 1964).

Prinzipiell kann man bei der Ausdehnung der Neuroblastome zwischen lokalisierten und disseminierten Erkrankungen unterscheiden. Die typische Tumorlokalisation ist bei Kindern über einem Jahr und bei Kindern unter einem Jahr unterschiedlich.

- **Kinder > 1 Jahr:** Etwa 50 % der Neuroblastome gehen von der Nebenniere aus und sind schon bei der Diagnose disseminiert (Stadium 4, siehe unten!). Während die andere Hälfte in den Ganglien des Grenzstrangs oder in anderen Paraganglien ihren Ursprung hat. 30 % von den vom Grenzstrang ausgehenden Neuroblastomen sind im Bauchraum lokalisiert, 13 % im Thorax und 5 % im Halsbereich. Beim metastasierten Neuroblastom befinden sich die Metastasen im Knochenmark (80 %), im Skelett (70 %), in tumorfernen Lymphknoten (20 %), in der Leber (20 %), in der Haut (8 %) oder im Gehirn (8 %).
- **Kinder < 1 Jahr:** Beim sogenannten „Säuglingsneuroblastom“ (Stadium 4S, siehe unten!) ist die primäre Lokalisation häufiger entlang des Grenzstrangs (zervikal, thorakal und abdominal) zu finden. In diesem Stadium ist selbst bei Metastasen die Prognose dennoch günstig. Die Metastasen befinden sich dabei hauptsächlich in der Leber (80 %) oder in der Subkutis (18 %) oder sehr spärlich im Knochenmark. Ist das Skelett befallen, so ist ein Stadium 4S ausgeschlossen.

Neuroblastome sind aufgrund ihres biologischen Verhaltens als sehr heterogen zu bezeichnen. Einige können sich spontan zurückbilden, andere können zu gutartigen Ganglioneuromen ausreifen und wieder andere zeichnen sich durch aggressives Wachstum mit denkbar

schlechter Prognose aus. Dieses unterschiedliche Verhalten korreliert offensichtlich mit dem Alter der Kinder. Die Fähigkeit des Säuglingsneuroblastoms zur spontanen Regression ist bei Kindern im ersten Lebensjahr gut belegt. Selbst bei Metastasierung in Leber, Haut oder sogar Knochenmark ist die Prognose insgesamt gut. Mit zunehmendem Alter der Patienten bei Erstdiagnose lässt jedoch die Regressions- und Differenzierungsfähigkeit der Neuroblastome nach. Dagegen zeigen sie ein aggressiveres Wachstum und neigen zur primären Metastasierung.

Da Neuroblastome als hormonaktive Tumore Einfluss auf die Synthese von Dopamin, Adrenalin und Noradrenalin haben, findet man bei 90 % der Patienten erhöhte Konzentrationen der Abbauprodukte Homovanillinsäure und Vanillinmandelsäure im Urin (LaBrosse EH, et al., 1980), was zusätzlich zu den bildgebenden Verfahren wie Sonographie und Magnetresonanztomographie (MRT) bei der Diagnosestellung wegweisend ist.

1.1.2. Stadieneinteilung des Neuroblastoms

In der Vergangenheit ist es von verschiedenen Gruppen unternommen worden, das Neuroblastom in bestimmte Stadien einzuteilen. Dabei standen Kriterien wie die Infiltration des Tumors über die Mittellinie und Befall der regionalen Lymphknoten im Vordergrund (Evans AE, et al., 1971; Hayes FA, et al., 1983). 1987 wurde schließlich aus den bisher veröffentlichten Systemen zur Stadieneinteilung ein internationales System, das „International neuroblastoma staging system“ (INSS), entwickelt (Brodeur GM, et al., 1988), das 1993 noch mal revidiert wurde (Brodeur GM, et al., 1993) und bis heute zur Anwendung kommt. Es ist wie folgt gegliedert:

Stadium 1:	<ul style="list-style-type: none">• Tumor ist auf das Ursprungsorgan begrenzt• Makroskopisch komplette Entfernung mit oder ohne mikroskopischem Resttumor• Verdächtige ipsi- und kontralaterale Lymphknoten histologisch negativ
Stadium 2a:	<ul style="list-style-type: none">• Unilateraler Tumor mit makroskopisch inkompletter Entfernung• Verdächtige ipsi- und kontralaterale Lymphknoten histologisch negativ
Stadium 2b:	<ul style="list-style-type: none">• Unilateraler Tumor mit makroskopisch kompletter oder inkompletter Entfernung• Ipsilaterale regionale Lymphknoten positiv• Verdächtige kontralaterale Lymphknoten histologisch negativ
Stadium 3:	<ul style="list-style-type: none">• Tumorinfiltration über die Mittellinie hinaus mit oder ohne Lymphknotenbefall oder unilateraler Tumor mit kontralateraler Lymphknotenbeteiligung oder Mittellinientumor mit bilateralem Lymphknotenbefall

Stadium 4: (ohne Stadium 4S)	<ul style="list-style-type: none">• Dissemination des Tumors zu entfernten Lymphknoten, zum Knochen, zum Knochenmark, zur Leber und/oder zu anderen Organen
Stadium 4S: (S = special)	<ul style="list-style-type: none">• Lokalisierter Primärtumor, wie beim Stadium 1, 2a oder 2b, mit Disseminierung nur in der Leber, der Haut und/oder im Knochenmark

15 % der klinisch diagnostizierten Kinder mit Neuroblastom sind dem Stadium 1 zuzuordnen, 12 % dem Stadium 2, 21 % dem Stadium 3 und 44 % dem Stadium 4. Nur bei ungefähr 8 % liegt ein Neuroblastom im prognostisch günstigen Stadium 4S vor.

1.1.3. Molekulargenetische Parameter des Neuroblastoms

Durch molekularbiologische Studien in den letzten Jahren zeigte sich mehr und mehr, dass neben der klinischen Klassifizierung nach dem internationalen System zur Stadieneinteilung gerade zytogenetische und molekulargenetische Veränderungen wichtige Aussagen über Risiko und Prognose einer Neuroblastomerkrankung machen.

1.1.3.1. Amplifikation und Expression des N-Myc-Gens

Eine häufige Form der Veränderungen auf chromosomaler Ebene ist die Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte. Zytogenetisch zeigen sich solche Genamplifikationen als zusätzliche extrachromosomal gepaarte DNA-Partikel, die sogenannten „double minutes“ Chromosomen (DMs) (Barker PE, 1982), und als homogen gefärbte Regionen (homogeneously-stained regions, HSRs), die das normale Bandenmuster eines Chromosoms unterbrechen (Cowell JK, 1982).

M. Schwab et al. beschrieb schon 1983 eine solche verstärkte Amplifikation des Onkogens N-Myc (N für Neuroblastom) bei Neuroblastomen (Schwab M, et al., 1983). Bei unbehandeltem primärem Neuroblastom kann das N-Myc-Gen 3- bis 300-fach pro haploidem Genom vorliegen (Brodeur GM, et al., 1983). Es zeigte sich, dass eine verstärkte N-Myc-Amplifikation bei Neuroblastomen mit aggressivem Wachstum und schlechter Prognose assoziiert ist (Brodeur GM, 1994; Schwab M, 1994). Die N-Myc-Amplifikation ist ein stabiles diagnostisches Kriterium. Fehlt die N-Myc-Amplifikation zum Diagnosezeitpunkt, so entwickelt diese sich in der Regel auch nicht in einem späteren Stadium der Erkrankung (Brodeur GM, et al., 1987).

Es sind auch Neuroblastome im fortgeschrittenen Stadium und mit aggressivem Wachstum beschrieben worden, die keine vermehrte N-Myc-Amplifikation aufweisen, aber verstärkt N-Myc-mRNA exprimieren (Wada RK, et al., 1993; Cohn SL, et al., 1990).

1.1.3.2. Chromosom-1p-Deletion

Neben der N-Myc-Amplifikation gibt es noch ein weiteres Kriterium auf chromosomaler Ebene, das zur Abschätzung von Risiko und Prognose der Neuroblastomerkrankung herangezogen werden kann.

Die Deletion am kurzen Arm des Chromosoms 1 in der Region 3, Bande 6 (1p36) ist eine charakteristische zytogenetische Abnormalität bei einem Großteil von Neuroblastomen bei Kindern, die älter sind als 1 Jahr, und in fortgeschrittenen Stadien (Brodeur GM, et al., 1992; Takeda O, et al., 1996). Diese Deletion ist mit einer schlechten Prognose assoziiert. Da die meisten Neuroblastome, die eine 1p-Deletion aufweisen, auch eine vermehrte N-Myc-Amplifikation zeigen, scheint es hier einen direkten Zusammenhang zu geben. Es wird vermutet, dass bei der Chromosom-1p36-Deletion ein Tumorsuppressorgen für N-Myc betroffen ist, und dass in diesem Bereich noch weitere Tumorsuppressorgene liegen könnten, die für die Entstehung und Progression des Neuroblastoms eine wichtige Rolle spielen (Cheng NC, et al., 1995; Maris JM, et al., 1995; Maris JM, et al., 1997).

1.1.3.3. Hyperploidie

Neuroblastome in ihren verschiedenen Stadien weisen unterschiedliche Karyotypen auf. So tritt ein aneuploider DNA-Gehalt häufig bei Säuglingsneuroblastomen und bei Neuroblastomen niedriger Tumorstadien auf, während ein nahezu diploider DNA-Gehalt in der Regel mit einer fortgeschrittenen Erkrankung und aggressiverem Wachstum verbunden ist (Look AT, et al., 1984). Allerdings scheint eine Aneuploidie des Neuroblastoms bei Kindern, die älter sind als ein Jahr, nicht mit einer günstigeren Prognose einherzugehen (Look AT, et al., 1991)

1.1.4. Therapie des Neuroblastoms

Die Therapie des Neuroblastoms kann man nicht nur von der Stadieneinteilung abhängig machen. Weitere entscheidende Kriterien sind das Alter, die N-Myc-Amplifikation und die Chromosom-1p-Deletion. So richtet sich die Therapie bei Säuglingen aufgrund der hohen Regressionstendenz zusätzlich stark nach klinischen Faktoren, wie zum Beispiel der Bedrohlichkeit der Symptome bei Erstpräsentation oder der Ausprägung einer Thrombozytopenie. Bei Kleinkindern und älteren Kindern erfolgt die Therapie entsprechend der Tumorstadien hauptsächlich in Abhängigkeit der Tumorausdehnung und Resezierbarkeit.

Die Amplifikation des N-Myc-Gens ist ein übergeordnetes Kriterium. Neuroblastome mit N-Myc-Amplifikation werden immer zur Hochrisikogruppe gezählt. Eine 1p-Deletion erhöht unabhängig der Stadieneinteilung immer das Risiko. Entsprechend dieser Kriterien wird in der aktuellsten Neuroblastomstudie, der NB2004 (Fassung vom 01.09.2004), die Einteilung in drei Risikogruppen vorgenommen (Abb. 1.1): Beobachtungsgruppe, Mittlerisikogruppe und Hochrisikogruppe.

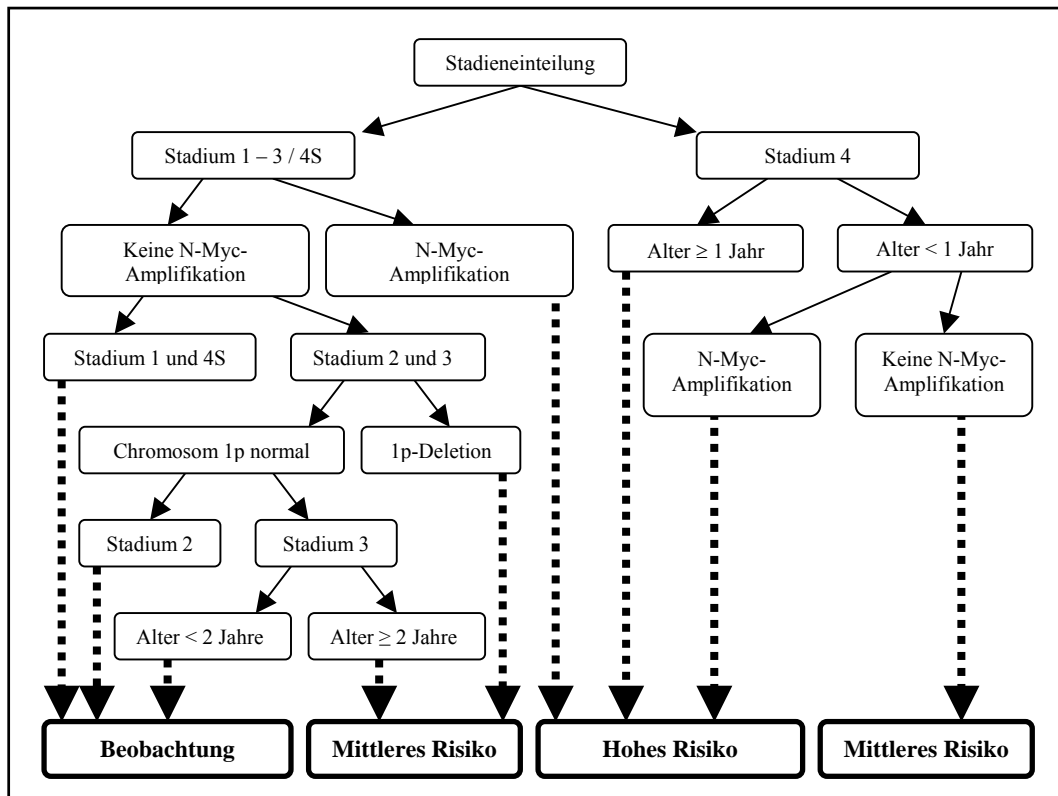


Abb. 1.1: Einteilung der Risikogruppen nach NB2004

Die Therapie des Neuroblastoms basiert vornehmlich auf drei Behandlungsmethoden:

- Operative Behandlung
- Chemotherapie
- Strahlentherapie

In Abhängigkeit des Zeitpunkts des operativen Eingriffs werden sowohl therapeutische als auch diagnostische Ziele verfolgt. Bei einer primären Operation soll als erstes Ziel eine vollständige Resektion erreicht werden. Zusätzlich können durch die Gewinnung von Tumormaterial histologische und molekularbiologische Untersuchungen durchgeführt werden, die zusammen mit der intraoperativen Bestimmung der Tumorausdehnung eine genauere und sicherere Diagnosestellung ermöglichen. Scheint ein chirurgischer Eingriff wenig Aussicht auf Erfolg zu haben, wird zur Diagnosesicherung zunächst eine Biopsie durchgeführt und die Tumoresektion erst nach einigen Zyklen Chemotherapie versucht. Bei einer vorgeschalteten Chemotherapie kommt der sekundären Operation neben der Tumorentfernung auch die Bedeutung der Beurteilung des Ansprechens des Tumors auf die

vorausgegangene Therapie zu. Beim disseminierten Säuglingsneuroblastom des Stadiums 4S kommt es oft infolge der Tumorausdehnung zu lebensbedrohlichen Situationen. So kann es durch eine exzessive Vergrößerung der Leber zur Ateminsuffizienz oder zum Kavakompressionssyndrom kommen. Bei solchen Patienten ist oft vor der Operation eine Strahlen- oder Chemotherapie notwendig, um das progrediente metastasierende Wachstum in Grenzen zu halten, bis die für das Stadium 4S charakteristische Rückbildung des Tumors einsetzt. Eine Resektion des Primärtumors wird in jedem Fall empfohlen, da immer wieder Rezidive beobachtet wurden.

Die Chemotherapie ist vor allem bei unvollständig resezierten Tumoren und bei disseminierten Neuroblastomen eine besonders wichtige Therapieoption. Im Rahmen der aktuellsten Neuroblastomstudie, der NB2004 werden folgende Substanzen eingesetzt: Doxorubicin, Cyclophosphamid, Ifosfamid, Cisplatin, Etoposid, Vincristin, Vindesin, Dacarbacin und Topotecan. Diese Substanzen werden je nach Risikogruppe in verschiedenen Kombinationen und bestimmten Reihenfolgen gegeben. Für Patienten der Hochrisikogruppe besteht die Option einer sogenannten Megatherapie mit autologer Stammzelltransplantation („Autologous stem cell transplantation“, ASCT). Dabei werden vor der Therapie aus dem peripheren Blut Stammzellen gesammelt, dann wird eine Hochdosistherapie durchgeführt, bei der die Knochenmarkstoxizität nicht limitierend ist, da zwei Tage nach Abschluss der Hochdosistherapie zur Rekonstitution der Blutbildung die zuvor gesammelten Stammzellen wieder infundiert werden. Zur Anregung der Haematopoese wird anschließend mit G-CSF (Granulozyten-Kolonien-stimulierender Faktor, „Granulocyte colony stimulating factor“) behandelt.

Im Allgemeinen sind Neuroblastome radio-sensitiv. Bei akuter Ateminsuffizienz bei Patienten im Stadium 4S erzielt man zum Beispiel gute Erfolge mit lokaler Strahlentherapie der Leber (Peschel RE, Chen M, Seashore J, 1991). In der NB2004-Studie wird lokale Radiotherapie bei Hochrisikopatienten für Primärtumore eingesetzt, wenn nach Chemotherapie und Zweitoperation noch kontrastmittel- und mIBG(meta-Jodbenzylguanidin)-speichernde Tumorreste vorhanden sind.

1.2. Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR)

Die Wirksamkeit der Weidenrinde gegen Fieber ist mindestens seit der ersten Hälfte des 19. Jahrhunderts gut bekannt. Schon 1829 wurde von H. Leroux das bittere Glycosid Salicin in reiner Form isoliert. Durch Hydrolyse dieses Glycosids erhält man Glucose und Salicylalkohol. Dieser kann *in vivo* oder durch chemische Manipulation zu Salicylsäure oxidiert werden. Das Natriumsalz der Salicylsäure wurde 1875 erstmals zur Behandlung des rheumatischen Fiebers eingesetzt. Aufgrund einer früheren Arbeit von Charles Gerhardt (1853) veresterte Felix Hoffmann, ein Chemiker der Bayer Chemiewerke, 1897 Salicylsäure mit Essigsäure und erhielt Acetylsalicylsäure, die in geringeren Dosen wirksamer und besser verträglich war als Natriumsalicylat. 1899 wurde dann die Acetylsalicylsäure unter dem Handelsnamen Aspirin® auf den Markt gebracht. In der Mitte des 20. Jahrhunderts folgten weitere Substanzen mit Aspirin®-ähnlicher Wirkung, darunter waren Phenylbutazon (1949), Acetaminophen oder Paracetamol (1955) und Indomethacin (1963). Der Begriff „nichtsteroidale Antirheumatika“ (NSAR) bzw. „non-steroidal anti-inflammatory drugs“ (NSAID) wurde zuerst 1949 von Rheumatologen geprägt, um die Wirkung von Phenylbutazon von der der Glucocorticoide zu unterscheiden, deren antiinflammatorische Eigenschaften bei der Behandlung der Arthritis gerade identifiziert worden waren.

1.2.1. Charakteristischer Wirkmechanismus

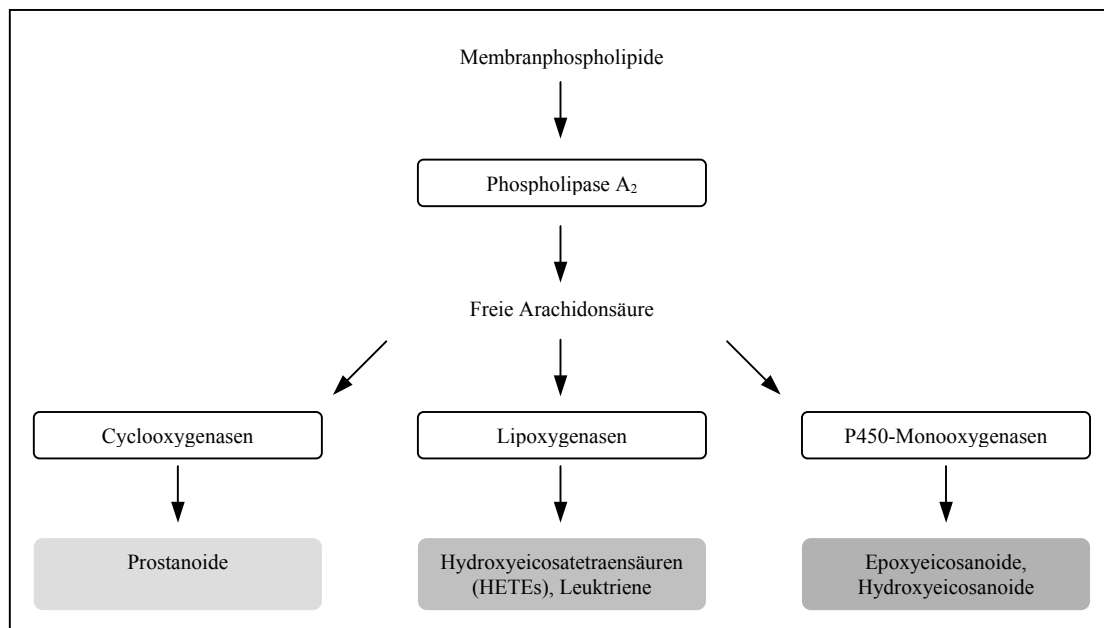


Abb. 1.2: Metabolismus der Arachidonsäure

Der Zusammenhang, dass NSAR die Synthese von Prostaglandinen hemmen, wurde 1971 von J.R. Vane entdeckt (Vane JR, 1971). Prostaglandine werden in den meisten Körperzellen

gebildet und wirken als autokrine und parakrine Mediatoren, die an einer ganzen Reihe von verschiedenen (patho-)physiologischen Funktionen beteiligt sind, wie Schmerz, Fieber, Thrombozytenaggregation, Nierendurchblutung, Uteruskontraktion etc. Sie gehören zur Gruppe der Eicosanoide (von griech. *eikos* = 20), die aus der 4fach ungesättigten C₂₀-Fettsäure Arachidonsäure gebildet werden. Arachidonsäure wird durch Aktivierung von Phospholipase A₂ aus Membranphospholipiden freigesetzt und je nach enzymatischer Ausstattung der jeweiligen Zellen weiter umgesetzt. Man kann drei Gruppen von Enzymen klassifizieren, die für die Metabolisierung der freien Arachidonsäure verantwortlich sind: die Cyclooxygenasen, Lipoxygenasen und P450-Monooxygenasen (Abb. 1.2).

Cyclooxygenasen (Cox) katalysieren die Bildung des instabilen Zwischenprodukts Prostaglandin H₂ (PGH₂), aus dem durch gewebsspezifische Isomerasen fünf verschiedene Prostanoiden (Abb. 1.3) mit unterschiedlichen Funktionen (Tab. 1.2) gebildet werden können.

Bis 1991 war lediglich eine Form von Cox bekannt. Mittlerweile kennt man drei Formen der Cox-Familie, die in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden (Tab. 1.1). Cox-1 wird konstitutiv neben anderen Geweben hauptsächlich in der Mucosa des Gastrointestinaltrakts und in den Thrombozyten exprimiert und ist dort für die Aufrechterhaltung der normalen physiologischen Funktionen verantwortlich. Erst in den frühen 90er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurde Cox-2 als das Enzym identifiziert, das vornehmlich mit entzündlichen Prozessen assoziiert ist (O'Banion MK, et al., 1991). Es wird konstitutiv in der Niere und im zentralen Nervensystem (ZNS) exprimiert, ist aber in vielen Geweben und Zellen während Entzündungsprozessen, Tumorgenese und durch mechanische oder chemische Stimuli induzierbar. Erst in jüngerer Zeit wurde eine dritte Cyclooxygenase, genannt Cox-3, identifiziert (Chandrasekharan NV, et al., 2002; Warner TD, Mitchell JA, 2002). Sie wird im cerebralen Kortex und im Herzmuskel exprimiert und kann neben anderen NSAR vor allem von Paracetamol (Acetaminophen) inhibiert werden, was das Phänomen erklären könnte, dass Paracetamol zwar gut wirksam gegen Schmerz und Fieber ist, aber nur geringe antiinflammatorische Aktivität besitzt.

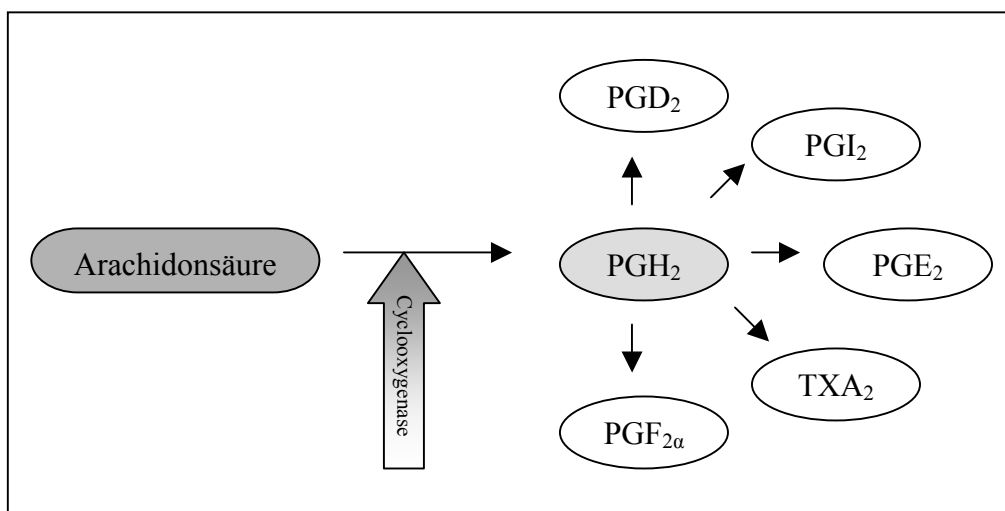


Abb. 1.3: Produkte der Cyclooxygenasen

	Konstitutive Expression	Induzierbare Expression	Wirkungen	Hemmende NSAR
Cox-1	Magenepithel, Thrombozyten	Wenig oder gar nicht unter physiologischen Bedingungen	Schmerz, Thrombozytenaktivierung, Schutz der Magenschleimhaut	Fast alle NSAR; minimale oder keine Hemmung durch Paracetamol und selektive Cox-2-Hemmer
Cox-2	Niere, ZNS	Induzierbar in nahezu allen Geweben durch Wachstumsfaktoren, Entzündungsmediatoren, Neurotransmitter, oxidativen Stress	Schmerz, Entzündung, Fieber, Angiogenese, Tumorgenese	Eigentlich alle NSAR, außer Paracetamol
Cox-3	ZNS, Herzmuskel	Unbekannt	Schmerz, Fieber	Paracetamol, geringere Hemmung auch durch andere NSAR

Tab. 1.1: Cyclooxygenasen (nach M. M. Bertagnolli, 2003)

Weil die Cyclooxygenasen selektiv oder nicht-selektiv die Zielstrukturen der NSAR sind, wurde die Expression und Wirkung der einzelnen Prostaglandine in den verschiedenen Geweben und Zellen gut untersucht. Die zellspezifische Expression der Prostanoiden ist einerseits abhängig von den der Cyclooxygenasen nachgeschalteten Enzymen, andererseits ist die Wirkung der Prostanoiden abhängig von den zellspezifisch exprimierten Rezeptor-Isoformen. So findet man zum Beispiel die Thromboxan-Synthase in Thrombozyten und Makrophagen, die Prostazyklin-Synthase in Endothelzellen, die PGF-Synthase im Uterus und die PGD-Synthase im Gehirn und in Mastzellen (Funk CD, 2001). PGE₂ ist das Hauptprostaglandin in den intestinalen Epithelzellen und wird dort von der mikrosomalen PGE-Synthase (mPGES), einem Enzym der MAPEG (**m**embrane-**a**ssociated **p**roteins in **e**icosanoid and **g**lutathione metabolism)-Familie, gebildet (Jakobsson PJ, et al., 1999). Auf Seiten der Prostanoid-Rezeptoren sind zur Zeit neun unterschiedliche Formen bekannt: vier Prostaglandin-Rezeptor-Subtypen binden PGE₂ (EP₁ - EP₄), zwei binden PGD₂ (DP₁, DP₂) und jeweils ein Rezeptor bindet PGF_{2α} (FP), PGI₂ (IP) und TxA₂ (TP). Alle diese Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte transmembrane Proteine, die eine ganze Reihe von nachgeschalteten Signaltransduktionswegen mit unterschiedlichen Wirkungen (Tab. 1.2) vermitteln (Coleman RA, Smith WL, Narumya S, 1994).

Rezeptor	Signalweg	Liganden	Wirkungen
DP₁, DP₂	cAMP↑	PGD	Vasodilatation, Hemmung der Thrombozytenaggregation, Erschlaffung der glatten Muskulatur von Gastrointestinaltrakt und Uterus
EP₁ EP₂	IP ₃ ↑ cAMP↑	PGE, PGF PGE	Kontraktion der glatten Muskulatur von Bronchien und Gastrointestinaltrakt Erschlaffung der glatten Muskulatur von Bronchien, Gastrointestinaltrakt und Gefäßen, Blutdrucksenkung
EP₃	cAMP↓	PGE	Hemmung der Säuresekretion des Magens, verstärkte Uteruskontraktionen während der Schwangerschaft, Hemmung der Lipolyse, Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung
EP₄	cAMP↑	PGE	Förderung der Schleimsekretion des Magens, Offenhaltung des Ductus arteriosus Botalli
FP	IP ₃ ↑	PGF	Uteruskontraktionen
IP	cAMP↑	PGI	Vasodilatation, Hemmung der Thrombozytenaggregation, Hemmung der Reninfreisetzung und Natriurese
TP	IP ₃ ↑	TXA, PGD	Thrombozytenaggregation, Vasokonstriktion, Bronchokonstriktion

Tab. 1.2: Prostanoid-Rezeptoren und Wirkungen von Prostanoiden (nach E. Mutschler, 2001)

Die Hemmung der Cyclooxygenasen durch NSAR führt zu einer verminderten Bildung aller Prostanoiden. Daraus lassen sich sowohl Wirkungen, als auch die Nebenwirkungen von Wirkstoffen dieser Stoffklasse ableiten: NSAR haben antiinflammatorische, antipyretische, analgetische und antithrombotische Effekte, außerdem aber auch unerwünschte Effekte auf Prostaglandin-vermittelte physiologische Mechanismen (Tab. 1.3).

Erwünschte Wirkungen	Unerwünschte Wirkungen
<ul style="list-style-type: none"> • antiinflammatorisch • antipyretisch • analgetisch • antithrombotisch (besonders für ASS) 	Gastrointestinaltrakt: <ul style="list-style-type: none"> • Übelkeit • Schmerzen • Diarrhoe • Obstipation • Ulzerationen und Blutungen
	Nieren: <ul style="list-style-type: none"> • Flüssigkeits- und Salzretention
	Blut: <ul style="list-style-type: none"> • Hemmung der Thrombozytenaggregation (besonders bei ASS) • Blutungen (besonders während der Schwangerschaft)
	ZNS, bei Dauertherapie (besonders bei Indomethacin): <ul style="list-style-type: none"> • Schwindel • Benommenheit • Kopfschmerzen

Tab. 1.3: Erwünschte und unerwünschte Wirkungen von klassischen unselektiven Cox-Hemmern

Die Wirkstoffe aus der Gruppe der NSAR wirken an den Cyclooxygenasen mit unterschiedlicher Aktivität, wobei die meisten klassischen NSAR Cox-1 und Cox-2 relativ unselektiv hemmen. Acetylsalicylsäure ist das einzige zur Zeit bekannte NSAR, das die Cyclooxygenasen kovalent und irreversibel hemmt. Cox-1 wird durch Acetylsalicylsäure am Serin-530 im aktiven Zentrum acetyliert, während es Cox-2 am homologen Serin in Position 516 acetyliert (Lecomte M, et al., 1994). Die Mehrheit der übrigen NSAR sind wie ASS organische Säuren, wirken aber, im Gegensatz zu ASS, hauptsächlich als reversible kompetitive Inhibitoren. Ein besonderer Vorteil der sauren NSAR ist, dass sie in entzündlichen Gebieten, in denen allgemein ein eher saurer pH herrscht, akkumulieren.

Um die Cox-1-abhängigen Nebenwirkungen der NSAR zu vermindern, hat man in den letzten Jahren viel Zeit und Geld für die Erforschung und Entwicklung von Cox-2-selektiven NSAR aufgewendet, die von der WHO (World Health Organization) Coxibe genannt wurden (Peterson WL, Cryer B, 1999; Willoughby DA, et al., 2000). Nachdem Rofecoxib wegen vermehrten Fällen von kardiotoxischen Nebenwirkungen im Oktober 2004 vom Markt genommen wurde, wurde im April 2005 auch der Verkauf und die Vermarktung von Valdecoxib ausgesetzt. Zur Zeit sind in Deutschland noch drei Coxibe (Celecoxib, Etoricoxib und Parecoxib) mit unterschiedlichen Indikationen im Handel.

1.2.2. *Einfluss von NSAR auf die Tumorgenese und Apoptose*

1.2.2.1. Untersuchungen mit Tier-Modellen

Bereits in den 70er Jahren des vergangenen Jahrhunderts kam die Hypothese auf, dass NSAR die Entwicklung und das Wachstum von kolorektalen Tumoren hemmen könnten, da von B. M. Jaffe (Jaffe BM, 1974) und von A. Bennet und M. Del Tacca (Bennet A, Del Tacca M, 1975) beschrieben wurde, dass in kolorektalem Tumorgewebe eine höhere PGE₂-Konzentration vorzufinden ist, als in der umgebenden normalen Mucosa. Dieser Erkenntnis folgten eine ganze Reihe von Untersuchungen an Ratten und Mäusen, durch die für verschiedene NSAR eine hemmende Wirkung auf chemisch induzierte kolorektale Karzinome nachweisbar war (Pollard M, Luckert PH, 1981; Metzger U, et al., 1984; Pollard M, Luckert PH, 1984; Reddy BS, et al., 1987; Moorghen M, et al., 1988; Craven PA, DeRubertis FR, 1992; Reddy BS, et al., 1993; Davis AE, Patterson F, 1994; Rao CV, et al., 1995; Reddy BS, et al., 1996; Kawamori T, et al., 1998; Barnes CJ, Lee M, 1999). Vom Prinzip her ähnelten sich die Tier-Modell-Versuche. Einerseits wurde den Mäusen oder Ratten eine subkutane Injektion eines chemischen Karzinogens zur Induktion von intestinalen Tumoren verabreicht, andererseits bekamen sie bestimmte Mengen von NSAR in ihr Futter oder Wasser. Die Versuche unterschieden sich vor allem im Wirkstoff, in der verabreichten Menge und im Zeitpunkt der ersten NSAR-Gabe im Verhältnis zur Exposition des Karzinogens. Alle diese Untersuchungen belegen für ASS und andere klassische NSAR, wie Indomethacin, Ibuprofen, Sulindac und Piroxicam, und auch für selektive Cox-2-Hemmer wie Celecoxib (Kawamori T, et al., 1998) eine hemmende Wirkung auf die chemisch induzierte Kanzerogenese. Bei den höchsten tolerierten NSAR-Dosen wurden Anzahl und Größe der Tumore im Durchschnitt um 40 – 60 % reduziert. Zwei Untersuchungen mit dem selektiven Cox-2-Hemmer Celecoxib haben gezeigt, dass hohe Dosen (1500 ppm im Futter) die Entwicklung von Tumoren sogar um 90 % inhibierten (Kawamori T, et al., 1998; Reddy BS, et al., 1996). Zusammenfassend kann man aus den zitierten Untersuchungen folgende Schlüsse ziehen. Erstens hat der Zeitpunkt der ersten NSAR-Gabe Einfluss auf das Resultat der Behandlung. So wird das Tumorstadium in größerem Umfang und schon bei geringeren Dosen gehemmt, wenn mit der Behandlung mit NSAR schon vor oder während der Exposition des Kanzerogens begonnen wird, als wenn die NSAR-Behandlung erst bei oder nach der Entstehung von Tumoren aufgenommen wird. Zweitens, Tumore im frühen Stadium werden sowohl von nicht-selektiven, als auch von selektiven NSAR effektiv in ihrem Wachstum gehemmt, während diese Wirkung im fortgeschrittenen Stadium bei selektiven Cox-2-Hemmern ausgeprägter ist. Drittens, um ein (Wieder-)Auftreten von Tumorstadium zu verhindern, ist es notwendig, dass die NSAR-Behandlung kontinuierlich und ohne Unterbrechung durchgeführt wird (Kudo T, et al., 1980; Narisawa T, et al., 1981).

Weitere Tier-Modell-Experimente belegen, dass NSAR auch verschiedene andere chemisch induzierte oder transplantierte Karzinome in ihrem Wachstum hemmen. So haben NSAR auch bei Tumoren der Brust, der Lunge, des Magens, der Prostata, des Ösophagus, der Harnblase und der Haut chemopräventive Effekte gezeigt (Rozic JG, et al., 2001; Liu CH, et al., 2001; Alshafie GA, et al., 2000; Nakatsugi S, et al., 2000; Yao R, et al., 2000; Duperron C, Castonguay A, 1997; Rioux N, Castonguay A, 1998; Lehnert T, et al., 1987; Shibata MA, et al., 1993; Tremblay C, et al., 1999; Liu XH, et al., 2000; Botha JH, et al., 1986; Okajima A, et al., 1998; Grubbs CJ, et al., 2000; Klan R, et al., 1993; Fischer SM, et al., 1999).

1.2.2.2. Epidemiologische Studien

In den letzten 10 bis 15 Jahren sind eine ganze Reihe von epidemiologischen Studien veröffentlicht worden, die einen Zusammenhang zwischen der regelmäßigen Einnahme von ASS und anderen NSAR und der reduzierten Inzidenz, adenomatöse Polypen oder kolorektale Karzinome zu entwickeln bzw. daran zu sterben, beschreiben (Thun MJ, et al., 1991; Greenberg ER, et al., 1993; Giovannucci E, et al., 1994; Peleg I, et al., 1994; Giovannucci E, et al., 1995; Martinez M, et al., 1995; Kauppi M, et al., 1996; Reeves MJ, et al., 1996; Sandler RS, et al., 1998; Smalley W, et al., 1999; Breuer-Katschinski B, et al., 2000; Coogan PF, et al., 2000; Garcia-Rodriguez LA, Huerta-Alvarez C, 2001). Die Ähnlichkeit der Ergebnisse dieser Studien ist bemerkenswert. Denn trotz unterschiedlichen Studiendesigns und verschiedener Patientengruppen war mit Ausnahme einer epidemiologischen Studie (Paganini-Hill A, et al., 1989) die Inzidenz, an adenomatösen Polypen oder kolorektalen Karzinomen zu erkranken oder daran zu sterben, bei Patienten, die regelmäßig NSAR einnahmen, im Vergleich zu unbehandelten Personen durchgängig um 30 – 50 % vermindert. Ergebnisse einiger Studien legen nahe, dass für den beschriebenen Effekt die Dauer und Kontinuität der NSAR-Einnahme entscheidender waren, als die Höhe der täglichen Dosis (Giovannucci E, et al., 1995; Collet JP, et al., 1999).

Andere epidemiologische Studien belegen, dass bei einer Langzeitanwendung von verschiedenen NSAR die Inzidenz, andere Tumore zu entwickeln, ebenfalls erniedrigt ist. So sind in der Literatur Studien zu Tumoren der Brust, der Harnblase, des Ösophagus, der Lunge, der Prostata, des Magens und der Ovarien beschrieben worden (Gridley G, et al., 1993; Thun MJ, et al., 1993; Schreinemachers DM, Everson RB, 1994; Egan KM, et al., 1996; Cramer DW, et al., 1998; Norrish AE, et al., 1998; Rodriguez C, et al., 1998; Harris RE, et al., 1999; Langman MJ, et al., 2000; Sharpe CR, et al., 2000; Tavani A, et al., 2000; Khuder SA, Mutgi AB, 2001). Durch diese epidemiologischen Studien kann allerdings lediglich eine Aussage darüber getroffen werden, dass NSAR einen Einfluss auf die Tumorgenese haben und damit wirksam in der Tumorphylaxe sind. Für eine prophylaktische Therapie wichtige Größen wie optimaler Wirkstoff, Dosis, Dosierungsintervall und Nutzen-Risiko-Verhältnis in den verschiedenen Personengruppen bleiben unklar.

1.2.2.3. Randomisierte Studien

Erst in jüngerer Zeit wurden randomisierte und Placebo-kontrollierte Studien unternommen, die den Effekt von ASS auf die Inzidenz von kolorektalen Adenomen untersuchen sollten. J.A. Baron et al. untersuchten die Wirkung von zwei unterschiedlichen Dosierungen von ASS an 1121 Patienten, bei denen gerade histologisch kolorektale Adenome diagnostiziert worden waren (Baron JA, et al., 2003). Die Patienten wurden in drei Gruppen randomisiert: Placebo (372 Patienten), 81 mg/d ASS (377 Patienten) und 325 mg/d ASS (372 Patienten). Nach einem Jahr war die Inzidenz von einem oder mehreren Adenomen 47 % in der Placebo-Gruppe, 38 % in der 81mg-ASS-Gruppe und 45 % in der 325mg-ASS-Gruppe ($p = 0,04$). Das relative Risiko, ein Adenom zu entwickeln, war verglichen mit der Placebo-Gruppe 0,81 für die 81mg-ASS-Gruppe (95% CI, 0,69 – 0,96) und für die 325mg-ASS-Gruppe 0,96 (95% CI, 0,81 – 1,13). Für fortgeschrittene Adenome, schwere Dysplasien und invasive Karzinome lag das relative Risiko in der 81mg-ASS-Gruppe bei 0,59 (95% CI, 0,38 – 0,92) und für die 325mg-ASS-Gruppe bei 0,83 (95% CI, 0,55 – 1,23). Das überraschende an dieser Studie ist, dass der chemopräventive Effekt von ASS bei geringerer Tagesdosis ausgeprägter war, als bei höherer Dosis.

In einer anderen randomisierten und Placebo-kontrollierten Studie wurden 635 Patienten, die vorher einmal kolorektale Tumoren hatten, mit 325 mg/d ASS oder Placebo behandelt (Sandler RS, et al., 2003). Dabei wurden drei Größen untersucht: die Inzidenz, ein oder mehrere Adenome zu entwickeln, die Zahl der wiederentwickelten Adenome und die Zeit zwischen Randomisierung und Wiederauftreten eines Adenoms. Alle drei Größen waren in der ASS-Gruppe signifikant erniedrigt.

In einer weiteren Studie wird die Inzidenz, die Größe und Anzahl von wiederauftretenden Adenomen an 272 Patienten mit vorherigem kolorektalem Adenom untersucht, die über vier Jahre täglich 160 oder 300 mg ASS-Lysin oder Placebo erhalten. Nach einem Jahr wurde bei 238 Patienten eine Koloskopie durchgeführt. Dabei ergab sich, dass das relative Risiko des erneuten Auftretens eines oder mehrerer Adenome in der ASS-Gruppe mit 0,73 signifikant erniedrigt gegenüber der Placebo-Gruppe war. Auch die Anzahl der Adenome mit $\varnothing > 5$ mm und $\varnothing > 10$ mm war in der ASS-Gruppe signifikant kleiner (Benamouzig R, et al., 2003).

Auch mit Cox-2-selektiven NSAR sind in den vergangenen Jahren randomisierte Placebo-kontrollierte Studien bezüglich kanzerogener und präkanzerogener Prozesse unternommen worden. So zum Beispiel eine Studie mit Celecoxib bei Männern mit klinisch lokalisiertem Adenokarzinom der Prostata (Heath EI, et al., 2002). Oder die multizentrische Phase IIb-Studie CBET (Chemoprevention for Barrett's Esophagus Trial). Bei dieser Studie wurden Patienten mit Barrett-Ösophagus, einem Risikofaktor für die Entwicklung eines Adenokarzinoms des Ösophagus, mit Celecoxib *versus* Placebo behandelt (Heath EI, et al., 2003). Als weitere Studie könnte man die APPROVe-Studie (Adenomatous Polyp Prevention On VIOXX) nennen, deren Ergebnisse bezüglich der kardiotoxischen Wirkungen Ende September 2004 zur weltweiten Marktrücknahme von Rofecoxib (VIOXX®) führte. Zwei weitere Studien zur Untersuchung des chemopräventiven Effekts von Rofecoxib wurden

wegen der unerwünschten kardiovaskulären Ereignisse ebenfalls im September 2004 abgebrochen. Die multizentrische VICTOR-Studie sollte Daten über den Effekt von Rofecoxib bei Patienten mit Kolonkarzinom liefern. Die ViP-Studie sollte zeigen, ob Rofecoxib das Risiko, an Prostatakrebs zu erkranken, senken kann.

1.2.2.4. Mechanistische Untersuchungen der Wirkung von NSAR auf die Apoptose

Obwohl immer noch in weiten Teilen Unklarheit darüber besteht, wie NSAR die Tumorgenese beeinflussen und hemmen, zeugen viele Untersuchungen davon, dass sie einerseits Einfluss auf Einleitung der Apoptose, des programmierten Zelltods, haben, und andererseits die Angiogenese, ein wichtiger Mechanismus für die Versorgung von wachsenden Tumoren, hemmen können.

Die Apoptose ist ein physiologisch wichtiger Prozess, der unentbehrlich für die Entwicklung und Funktion eines Organismus ist. Die zentrale Bedeutung der Apoptose ist die Erhaltung der Homöostase von Geweben und Organen, das heißt, dass die Zellzahl in bestimmten Grenzen konstant gehalten werden soll. So muss der Zuwachs von Zellen infolge von Zellteilung durch apoptotische Prozesse kompensiert werden, bei denen nicht mehr funktionsfähige, geschädigte oder gealterte Zellen eliminiert werden. Wird das Programm der Apoptose gestört, kommt es zu pathologischem Wachstum, wie es bei Tumoren der Fall ist, oder die Zellzahl verringert sich in pathologischer Weise.

Der Prozess der Apoptose wird begleitet von charakteristischen morphologischen Veränderungen der Zellen. Bei Initialisierung der Apoptose beginnt eine adhäsive Zelle sich

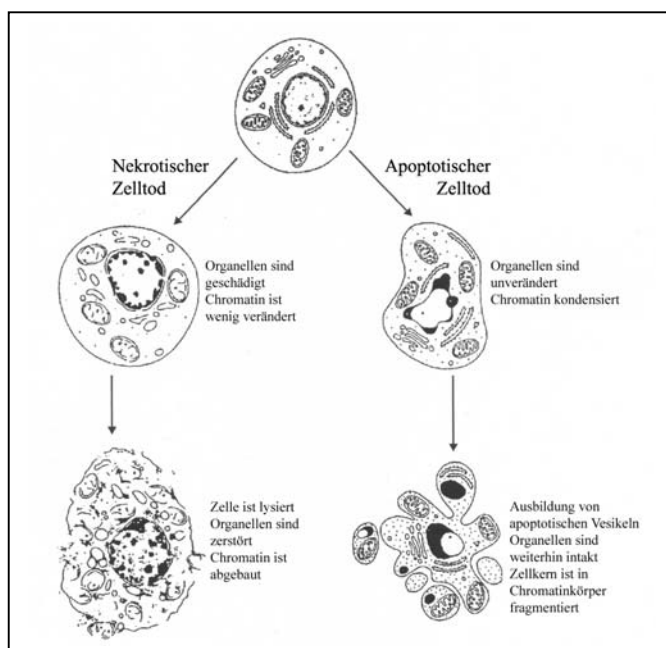


Abb. 1.4: Der apoptotische Zelltod lässt sich durch morphologische Charakteristika vom nekrotischen Zelltod unterscheiden (nach Darzynkiewicz Z, et al., 1992).

abzurunden und die DNA im Zellkern kondensiert. Die DNA wird abgebaut und der Kern wird in diskrete Chromatinkörper fragmentiert. Es bilden sich membrangebundene apoptotische Vesikel aus, die den apoptotischen vom nekrotischen Zelltod abgrenzen (Abb. 1.4). Schließlich zerfällt die Zelle und wird im Verband eines Organismus phagozytiert.

Auf molekularer Ebene erscheinen die Mechanismen der Apoptose sehr vielschichtig und noch nicht vollständig geklärt. Es werden verschiedene Mechanismen beschrieben, die Einfluss auf apoptotische Prozesse haben, und

die zum Teil miteinander verknüpft sind. So ist in den letzten Jahren viel an Apoptose-Signalwegen geforscht worden, die eine Aktivierung von Proteasen aus der Caspase-Familie bedingen. Der Begriff Caspase leitet sich von dem englischen „cysteiny l aspartate **s**pecific **p**rotease“ ab. Der Caspase-Familie gehören eine ganze Reihe von Proteasen an, die Cystein in ihrem aktiven Zentrum haben und ihre Substrate stets am Aspartat in der Aminosäuresequenz erkennen und spalten. Caspasen vermitteln den Zelltod nicht durch eine allgemeine Proteinzerstörung, sondern indem bestimmte Proteine, die für die Aufrechterhaltung der Zellstruktur wichtig sind, abgebaut werden. Ein Beispiel für die zielgerichtete Wirkung der Caspasen ist der Verdau eines Proteins, das die DNase CAD (**c**aspase **a**ctivated **D**Nase) hemmt, sodass CAD zur Zerstörung der DNA frei wird.

Es wurden zwei Apoptose-Signalwege charakterisiert, die über eine Aktivierung von Caspasen funktionieren. Und zwar spricht man vom extrinsischen oder Todesrezeptor-vermittelten Signalweg und vom intrinsischen oder Mitochondrien-vermittelten Signalweg (Hengartner MO, 2000). Zusätzlich zu den Mitochondrien haben auch noch andere Organellen wie das Endoplasmatische Retikulum (ER), der Golgi Apparat und Lysosomen Einfluss auf die Vermittlung der Apoptose (Ferri KF, Kroemer G, 2001).

Der extrinsische Signalweg wird an der Zelloberfläche durch spezifische Liganden, die an entsprechende Todesrezeptoren binden, aktiviert (Abb. 1.5). Am besten untersucht sind die Rezeptoren der Tumornekrose-Faktor-Rezeptor(TNFR)-Familie. Dazu gehören der TNF-Rezeptor, der TRAIL(TNF-related apoptosis-inducing ligand)-Rezeptor und der Fas-Rezeptor. Die extrazelluläre Bindung von Liganden bewirkt intrazellulär das Andocken von Adaptermolekülen (z. B. FADD, RIP1), die wiederum Procaspase 8 zu Caspase 8 aktivieren, die über weitere Effektor-Caspasen wie Caspase 3 und Caspase 6 eine proteolytische Kaskade initiiert, die im apoptotischen Zelltod mündet (Thornberry NA, Lazebnik Y, 1998; Ashkenazi A, Dixit VM, 1998).

Verschiedene Stimuli wie Hitzeschock, Stressfaktoren, freie Radikale, UV-Strahlen und unterschiedliche Wirkstoffe und Toxine können unter Umgehung der Todesrezeptoren über den intrinsischen Signalweg Apoptose vermitteln. Dieser Signalweg beruht auf der veränderten Permeabilität der mitochondrialen Membranen zur Freisetzung von sogenannten AMPs (**a**poptogenic **m**itochondrial **p**roteins). Zu diesen AMPs gehören Cytochrome c, Endonuclease G, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, AIF (**a**poptosis-**i**nducing **f**actor) und das Homologon AMID (**A**IF-homologous **m**itochondrion-associated **i**nducer of **d**eath) (Li LY, et al., 2001; van Loo G, et al., 2001; Liu X, et al., 1996; Chai J, et al., 2000; van Loo, et al., 2002; Susin SA, et al., 1999; Wu M, et al., 2002). Diese Proteine vermitteln zum Teil auch Caspase-unabhängig Apoptose. Für den mitochondrialen Weg der Apoptose spielen die Mitglieder der Bcl-2-Familie eine besondere Rolle. Durch Induktion von pro-apoptotischen Bcl-2-Mitgliedern wie Bax, Bad und Bak werden die anti-apoptotischen Mitglieder Bcl-2 und Bcl-X_L, die in der äußeren mitochondrialen Membran ansässig sind, destabilisiert und AMPs werden über Poren in der äußeren Membran der Mitochondrien freigegeben (Adams JM, Cory S, 1998; Reed JC, et al., 1998). Die Mechanismen, durch die sich das Verhältnis der pro-

apoptotischen zu den anti-apoptotischen Bcl-2-Mitgliedern verändert und durch die AMPs freigesetzt werden, sind noch nicht völlig geklärt.

Der extrinsische Signalweg ist über Bid, ein Mitglied der Bcl-2-Familie, mit dem intrinsischen verknüpft (Abb. 1.5). Bid ist ein Substrat der Caspase-8 und wird durch Abspaltung einer Aminosäuresequenz zu tBid prozessiert, das eine Translokation vom Cytosol in die äußere Membran der Mitochondrien erfährt und dort die Öffnung von Poren auslöst, sodass AMPs wie Cytochrom c und Endonuclease G ausströmen und ihre apoptotische Wirkung entfalten können. tBid scheint auch eine Konformationsänderung von Bax, einem anderen pro-apoptotischen Mitglied der Bcl-2-Familie, zu bewirken, sodass es sich ebenfalls in der äußeren Mitochondrienmembran ansiedelt und dort einen ähnlichen Effekt hat wie tBid (Shimizu S, et al., 1999).

NSAR scheinen an verschiedenen Stellen Einfluss auf die beschriebenen Signalwege zu haben (Abb. 1.5). So induziert PGE₂ die Expression des anti-apoptotischen Bcl-2 und vermittelt damit Überleben und Wachstum von Zellen eines Cox-2-exprimierenden Kolonkarzinoms. Dieser Effekt wird durch den Einsatz eines hochselektiven Cox-2-Inhibitors gehemmt (Sheng H, et al., 1998). Auch an einer Zelllinie eines Prostatakarzinoms wurde die Wirkung eines selektiven Cox-2-Inhibitors, NS398, bezüglich der Apoptose untersucht. Dabei wurde eine verminderte Expression von Bcl-2 beobachtet, gefolgt von den typischen morphologischen Veränderungen der Zellen bei Apoptose (Liu XH, et al., 1998).

Sulindacsulfid, der Hauptmetabolit des NSAR Sulindac, vermittelt an Kolon- und Prostatakarzinom-Zelllinien über den sogenannten Todesrezeptor-Signalweg die Apoptose. Der Todesrezeptor DR5 wird hochreguliert und über die Aktivierung der Caspase 8 die proteolytische Kaskade des programmierten Zelltods angestoßen (Huang Y, et al., 2001).

Für Sulindacsulfid und ebenso für Indomethacin wird auch ein Einfluss auf den mitochondrialen Signalweg beschrieben. So zeigen Zelllinien von humanen kolorektalen Karzinomen, denen das Gen für das pro-apoptotische Bax-Protein fehlt, keinen apoptotischen Effekt nach Behandlung mit Sulindacsulfid und Indomethacin, während bei Zelllinien, die dieses Gen besitzen, bei gleicher Behandlung die Apoptose eingeleitet wird. Dabei wird die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-X_L durch diese NSAR gehemmt, sodass sich das Verhältnis von Bax und Bcl-X_L zugunsten von Bax verändert und so der mitochondrial-vermittelte Zelltod eingeleitet wird (Zhang L, et al., 2000). Auch an Magenkarzinom-Zelllinien wurden durch den Einfluss von NSAR Expressionsänderungen von Proteinen der Bcl-2-Familie beobachtet. Durch die Behandlung mit ASS und Indomethacin wird nicht nur das Bax-Protein vermehrt exprimiert, sondern auch ein weiteres pro-apoptotisches Protein, Bak, während die Bcl-2-Konzentration konstant bleibt. Diese Veränderungen werden von einer erhöhten Caspase-3-Aktivität begleitet (Zhou XM, et al., 2001). Auch für Kolonkarzinomzellen wird eine Caspase-3-abhängige Apoptose beschrieben (Kim WH, et al., 2000).

Zwei weitere Arbeiten belegen, dass durch ASS induzierte Apoptose mit der mitochondrialen Freisetzung von Cytochrom c, einem „apoptogenic mitochondrial protein“ (AMP), verknüpft ist (Piqué M, et al., 2000; Zimmermann KC, et al., 2000). Cytochrom c bindet an Apaf-1 und

aktiviert Caspase 9, die durch weitere Effektor-Caspasen Apoptose induziert (Li P, et al., 1997; Slee EA, et al., 1999).

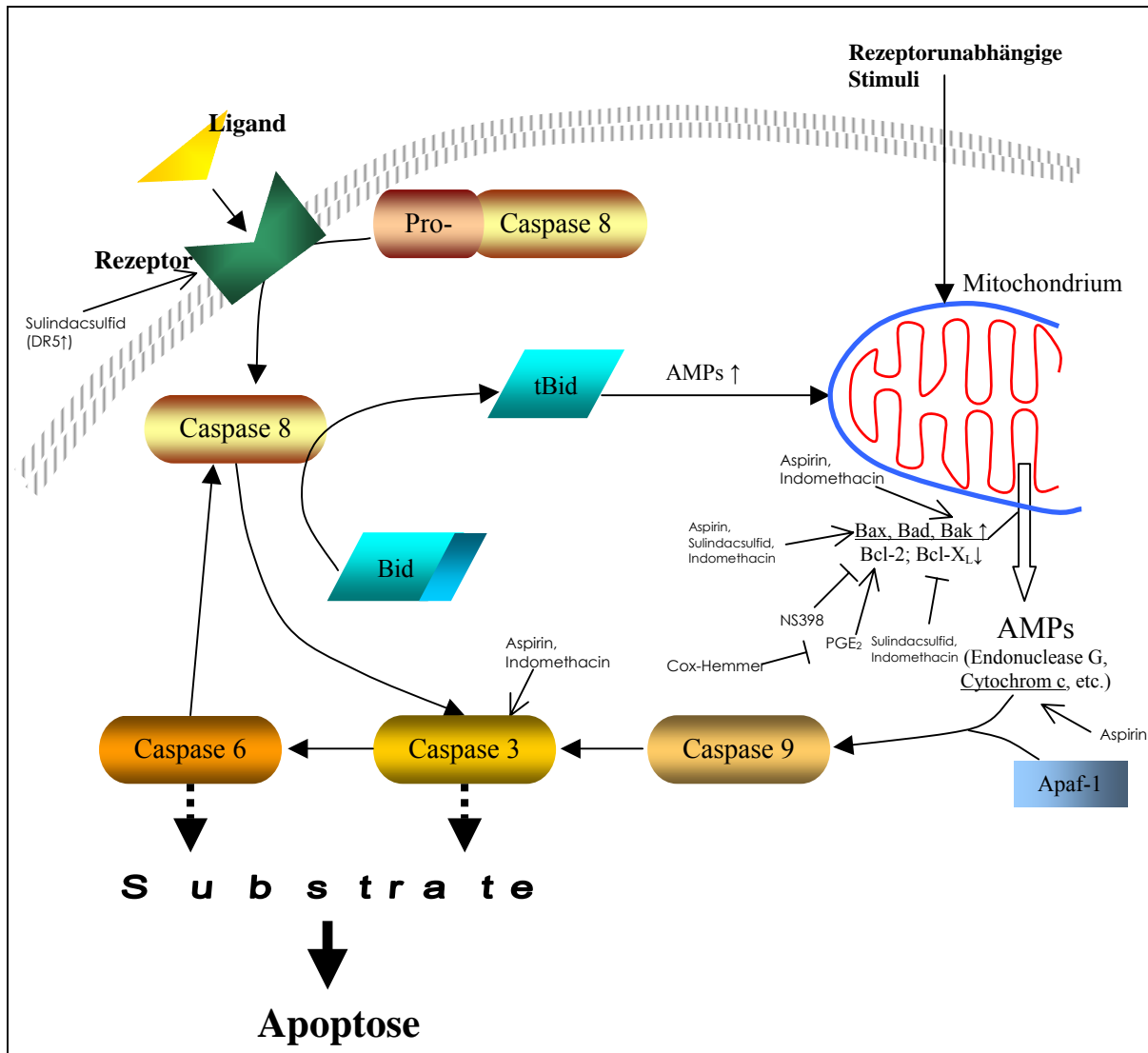


Abb. 1.5: Einflussnahme von NSAR auf die Signalwege der Apoptose

Andere Untersuchungen weisen auf weitere Mechanismen hin, durch die NSAR den programmierten Zelltod einleiten oder das Wachstum von Zellen hemmen. So wurde bei der Behandlung von Tumorzellen des Kolons mit NSAR eine starke Erhöhung der intrazellulären Konzentration von Arachidonsäure beobachtet. Arachidonsäure wiederum stimuliert die Umwandlung von Sphingomyelin zu Ceramid, einem Vermittler der Apoptose (Chan TA, et al., 1998).

NSAR haben auch Einfluss auf den Metabolismus von Linolsäure, eine wie Arachidonsäure mehrfach ungesättigten Fettsäure, die von 15-Lipoxygenase-1 (15-LOX-1) umgesetzt wird. So wird sowohl in Kolonkarzinom-, als auch in Ösophaguskarzinom-Zelllinien, die einen Mangel an 15-LOX-1 aufweisen, durch den Einsatz von NSAR wie Sulindac und NS398 die Expression von 15-LOX-1 erhöht (Shureiqi I, Chen D, Lee JJ, et al., 2000; Shureiqi I, Chen D, Lotan R, et al., 2000, Shureiqi I, et al., 2001). 15-LOX-1 metabolisiert Linolsäure zu

Hydroxyoctadecadiensäure (13-*S*-HODE), einem Induktor der Apoptose. Diese Effekte werden auch in Abwesenheit von Cox-2 beobachtet.

Ein anderer Mechanismus wird für ASS, Natriumsalicylat und Sulindac beschrieben. Diese NSAR hemmen die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (**n**uclear **f**actor- κ B) und die nachfolgenden Signaltransduktionswege (Pierce JW, et al., 1996; Yin MJ, et al., 1998; Yamamoto Y, et al., 1999). NF- κ B ist durch Aktivierung entsprechender Gene an der Regulation von inflammatorischen und immunologischen Prozessen beteiligt (Baldwin AS, 1996; Pahl HL, 1999). NF- κ B stimuliert auch die Expression von Cox-2 und vermittelt die Expression von Genen, deren Produkte die zelluläre Proliferation und Apoptose kontrollieren (Barkett M, Gilmore TD, 1999). So werden anti-apoptotische Gene direkt von NF- κ B aktiviert (Wang CY, et al., 1998). ASS und Natriumsalicylat inhibieren die Aktivierung von NF- κ B, indem sie die ATP-Bindung an die I κ B-Kinase IKK β behindern, sodass die IKK β -abhängige Phosphorylierung des NF- κ B-Inhibitors I κ B α stark reduziert ist. Aufgrund der mangelnden Phosphorylierung wird I κ B α nicht vom Proteasom abgebaut und verhindert damit die Translokation von NF- κ B vom Cytosol in den Nukleus. Indomethacin jedoch scheint den NF- κ B-Signalweg nicht zu hemmen. Eine andere Untersuchung weist darauf hin, dass die Hemmung der NF- κ B-Aktivierung von der MAPK (**m**itogen-**a**ctivated **p**rotein **k**inase) p38 abhängig ist, da p38 durch Natriumsalicylat aktiviert wird und die Wirkung von Natriumsalicylat auf I κ B α durch den Einsatz eines hochspezifischen MAPK p38-Inhibitors verhindert wird (Schwenger P, et al., 1998).

NSAR wie Sulindac, Indomethacin und NS398 scheinen allerdings die Aktivierung von ERK (**e**xtracellular signal-**r**egulated **k**inase) 1 und 2, zwei andere Isoformen der MAPK, im Gegensatz zu p38 zu hemmen (Rice PL, et al., 2001; Husain SS, et al., 2001). Dadurch bleibt die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren aus, die für die Steigerung der Proliferation der Zellen und für die Hemmung der Apoptose zuständig sind (Lewis TS, et al., 1998).

Ein anderer Mechanismus ist für den selektiven Cox-2-Hemmer Celecoxib beschrieben worden. So wird in Prostatakarzinomzellen durch die Behandlung mit Celecoxib die Aktivierung der anti-apoptotischen Kinase Akt blockiert (Hsu AL, et al., 2000).

Als weitere Mechanismen der Apoptose-Induktion einiger NSAR wird die Hemmung der K-ras-abhängigen Cox-2-Expression (Taylor MT, et al., 2000) oder die Erhöhung der mRNA-Expression des Tumorsuppressorgens APC (**a**denomatous **p**olyposis **c**oli) diskutiert (Kishimoto Y, et al., 2000). APC wiederum unterdrückt die Transkription des c-MYC-Oncogens (He TC, et al., 1998).

Durch diesen Ausschnitt an verschiedensten mechanistischen Untersuchungen wird deutlich, dass einzelne Mechanismen der Wirkung von NSAR auf Zell-Proliferation und Apoptose zwar bekannt sind, aber noch weitgehend unklar ist, ob es einen generellen Apoptose-einleitenden Mechanismus gibt und ob es zwischen den zum Teil kontrovers diskutierten Mechanismen ein Zusammenspiel gibt.

1.2.2.5. Mechanistische Untersuchungen der Wirkung von NSAR auf die Angiogenese

Solide Tumoren müssen die Bildung von neuen kapillaren Blutgefäßen stimulieren, um überhaupt über eine Größe von wenig mehr als 2 mm Durchmesser hinaus wachsen zu können (Holash J, et al., 1999). Sowohl für nicht-selektive als auch für selektive NSAR wird eine Hemmung dieses Mechanismus der Angiogenese und Neovaskularisierung beschrieben (Tsujii M, et al., 1998; Jones MK, et al., 1999), was in einer Wachstumshemmung der Tumoren resultiert. Andere Arbeiten jedoch führen die Hemmung der Angiogenese von Tumoren in der Hauptsache auf die Hemmung der Cox-2 zurück, deren Expression in den meisten gefäßbildenden kolorektalen adenomatösen Polypen und in Karzinomen von Kolon, Lunge, Brust, Ösophagus und Prostata erhöht ist (Masferrer JL, et al., 2000; Williams CS, et al., 2000; Gallo O, et al., 2001; Dormond O, et al., 2001). Auf jeden Fall wird die mRNA- und Proteinexpression der angiogenetischen Wachstumsfaktoren VEGF (**v**ascular **e**ndothelial **g**rowth **f**actor) und bFGF (**b**asic **f**ibroblast **g**rowth **f**actor) durch PGE₂ stimuliert (Cheng T, et al., 1998; Pai R, et al., 2001). Es liegt daher nahe, dass NSAR die Angiogenese über die Hemmung der PGE₂-vermittelten Expression von Wachstumsfaktoren wie VEGF blockieren (Williams CS, et al., 2000). Jedoch werden verschiedene Mechanismen der Angiogenesehemmung beschrieben, sodass der Eindruck entsteht, dass die Wirkung der NSAR auf die Angiogenese und auf die Regulation von Angiogenese-vermittelnden Wachstumsfaktoren multifaktoriell ist.

So wurde beschrieben, dass die MAP-Kinase ERK2 an der NSAR-vermittelten Angiogenesehemmung beteiligt ist. An verschiedenen Endothelzellen wurde beobachtet, dass eine Behandlung mit unselektiven und Cox-2-selektiven NSAR die bFGF- oder VEGF-abhängige Aktivierung von ERK2 hemmte, sodass eine Translokation in den Nukleus ausblieb (Jones MK, et al., 1999).

Außerdem scheinen NSAR auf regulierende Proteine des Zellzyklus Einfluss zu nehmen, sodass die Proliferation von Endothelzellen gehemmt wird. So wurde von R. Pai et al. beschrieben, dass die Hemmung der Proliferation durch Indomethacin signifikant mit der Abnahme von Cyclin D₁ und der Zunahme der Proteinexpression von p21 korrelierte. Außerdem verminderte Indomethacin die Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins (Pai R, et al., 2001).

Ein wichtiger Transkriptionsfaktor für die Angiogenese ist Egr-1 (**e**arly **g**rowth **r**esponse **f**actor 1). Dieser Faktor wird durch eine ganze Reihe von extrazellulären Signalen und durch Gewebsschädigungen in kurzer Zeit aktiviert (Bryan M, et al., 2000). Auch durch Hypoxie wird die Expression und transkriptionale Aktivität von Egr-1 hochreguliert (Yan SF, et al., 2000). Egr-1 ist hauptsächlich bei der Induktion des VEGF-Rezeptors Flt-1 nach mechanischer Verletzung von Endothelzellen involviert (Vidal F, et al., 2000). Durch exogenen VEGF wird in Endothelzellen die Expression von Egr-1 induziert. Dieser Effekt kann durch NSAR gehemmt werden. Dabei wird die mRNA- und Proteinexpression von

Egr-1 sowohl von Indomethacin, einem unselektiven Cox-1/Cox-2-Hemmer, als auch von NS398, einem selektiven Cox-2-Hemmer, inhibiert (Szabo IL, et al., 2001).

Die Expression von VEGF und Flt-1 wird durch einen Komplex von HIF-1 α (**hypoxia inducible factor**) und HIF-1 β reguliert. Eine Bindung des HIF-Komplexes an einen Bereich in der Promoterregion des VEGF/Flt-1-Gens, der HRE (**hypoxia response element**) genannt wird, bewirkt die Rekrutierung von weiteren Transkriptionsfaktoren, die die Transkription von VEGF und Flt-1 initiieren (Levy AP, et al., 1996; Gerber HJP, et al., 1997; Forsythe JA, et al., 1995; Pugh CW, Ratcliffe PJ, 2003). HIF-1 α ist nur unter den Bedingungen der Hypoxie stabil. Unter normalen Umständen bindet HIF-1 α an das Tumorsuppressorprotein VHL (**von-Hippel-Lindau**), was zu einer Reaktion mit Ubiquitin und zu einem schnellen Abbau führt (Jaakkola P, et al., 2001). Untersuchungen von M.K. Jones et al. zu hypoxieinduzierter Angiogenese zeigen, dass die Expression von VHL durch NSAR verstärkt, während die Expression von HIF-1 α erniedrigt wird, sodass es zu einer verminderten Expression von VEGF und Flt-1 kommt (Jones MK, et al., 2002). Eine andere Untersuchung zeigt, dass PGE₂ die Stabilisierung von HIF-1 α induziert (Liu XH, et al., 2002). Eine Hemmung der PGE₂-Synthese durch NSAR könnte also zu einem vermehrten Abbau von HIF-1 α führen und damit zu einer geringeren Expression von VEGF und Flt-1.

Ein weiterer Mechanismus für die Angiogenesehemmung durch NSAR könnte die schon im vorigen Abschnitt beschriebene hemmende Wirkung auf die Zell-Proliferation und die Induktion von Apoptose sein. Diese Wirkung wurde bereits *in vivo* für Celecoxib an angiogenetischen Endothelzellen gezeigt (Leahy KM, et al., 2002).

Eine andere Untersuchung weist einen Zusammenhang zwischen Stickstoffmonoxid (NO) und der Angiogenesehemmung durch NSAR auf. Dabei wurde gezeigt, dass Indomethacin die Expression der NO-Synthase hemmt (Santos AM, et al., 1995). Da NO dafür bekannt ist, die Angiogenese zu stimulieren (Morbideilli L, et al., 2003), könnte dieser Mechanismus auch für die NSAR-vermittelte Angiogenesehemmung verantwortlich sein.

Zuletzt bleibt noch ein 2001 entdeckter Zusammenhang zwischen NSAR und Endostatin zu erwähnen. Endostatin ist ein endogener Inhibitor der Angiogenese, indem es die endotheliale Proliferation durch Stabilisierung von Mikrogefäßen unterdrückt. Sowohl Celecoxib, als auch Flurbiprofen bewirken im Serum in Relation zu VEGF eine erhöhte Endostatin-Konzentration (Ergun S, et al., 2001).

Ob es einen Mechanismus gibt, und wenn, welcher das ist, der hauptsächlich für die beobachtete Hemmung der Angiogenese durch NSAR verantwortlich ist, bleibt zu klären. Auch ist bisher nicht klar, ob und wie die diskutierten Mechanismen im Zusammenhang stehen.

1.3. Proteomforschung

1.3.1. Definition „Proteom“

Die Bezeichnung „Proteom“ ist noch relativ neu und wird in Anlehnung an den Begriff „Genom“, der für die Gesamtheit aller Gene eines Organismus steht, gebraucht. Als vereinfachende Definition kann man sagen, dass ein Prote-om das **Protein**-Komplement ist, das durch das **Genom** eines Organismus in einem Gewebe, einer Zellart oder einer Körperflüssigkeit exprimiert wird.

Geprägt wurde dieser Begriff 1995 bzw. 1996 durch Veröffentlichungen von V. C. Wasinger et al. und M. R. Wilkins et al. (Wasinger VC, et al., 1995; Wilkins MR, et al., 1996).

Als einen weiteren Begriff der Molekularbiologie mit der Endung „-om“ findet man in der Literatur das „Transkriptom“. Dabei richtet sich das Augenmerk auf die Expression der mRNA eines Organismus, die ebenfalls je nach Gewebe, Zellart oder Körperflüssigkeit unterschiedlich ist.

1.3.2. Vom Genom zum Proteom

Obwohl die Technik, der zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE), die heute als wichtigste Methode in der Proteomforschung (Neudeutsch: Proteomics) gilt, schon 1975 von J. Klose und P.H. O'Farrell unabhängig voneinander entwickelt wurde (O'Farrell PH, 1975; Klose J, 1975), ist der Beginn der sogenannten Genomforschung (Genomics) früher anzusetzen, als der der Proteomforschung. Als Start des Genom-Zeitalters kann man vielleicht das Jahr 1977 nennen, als F. Sanger die erste komplette DNA eines Organismus, des Virus ψ X174, sequenziert hatte (Sanger F, et al., 1977).

Aber erst 1985 wurde die zur wichtigsten Methode der Genomforschung gewordene Polymerasekettenreaktion (**p**olymerase **c**hain **r**eaction, PCR) von K. Mullis entwickelt (Saiki RK, et al., 1985), durch die die Erforschung der Genome stark beschleunigt wurde. Man hatte nun ein Werkzeug, um DNA zu amplifizieren und das allgemeine Interesse richtete sich daher zunächst auf die Erforschung der Gene. So wurde 1996 das erste vollständig sequenzierte eukaryotische Genom von *Saccharomyces cerevisiae* veröffentlicht (Goffeau A, et al., 1996) und zwei Jahre später das Genom der Nematode *Caenorhabditis elegans* (The C. elegans sequencing consortium, 1998). Mittlerweile gilt das Humangenom-Projekt, das bereits in den 80er Jahren begonnen wurde, als weitestgehend abgeschlossen (Lander ES, et al., 2001; Venter JC, et al., 2001). Wie noch gezeigt werden soll, profitiert auch gerade die Proteomforschung von der Entschlüsselung der Genome, besonders der des humanen Genoms.

Das ursprüngliche Ziel der Genomforschung war die Sequenzierung, Kartierung und Analyse von Genomen. Jedoch reicht selbst die Beschreibung des kompletten Genoms eines Organismus nicht aus, um seine funktionelle Organisation wie z. B. die Regulation der Genexpression, die Zuordnung von Phänotypen zu Genotypen oder die Entstehung von Krankheiten und pathologischen Entgleisungen von Stoffwechsel- und Signaltransduktionswegen zu verstehen. Daher wird im sogenannten „Post-Genom-Zeitalter“ im Decodieren und Verstehen der Genominformationen und ihrer Zusammenhänge bezüglich Regulation und Funktion die größte Herausforderung liegen (Abbott A, 1999). Man spricht in diesem Zusammenhang auch von funktioneller Genomforschung oder „functional genomics“. In der Disziplin der funktionellen Genomanalyse stehen Methoden im Mittelpunkt des Interesses, mit denen man Aussagen über die örtliche, zeitliche und quantitative Expression der Gene machen kann. Dabei geht es darum, Zelltyp, physiologisches Stadium oder pathologische Mechanismen anhand von Expressionsmustern der RNA zu beschreiben und Kataloge aller exprimierten Sequenzen eines Organismus aufzustellen. Das Augenmerk richtet sich also auf das sogenannte Transkriptom.

Zur Erfassung von exprimierten Sequenzen eines Genoms wurden mithilfe von mRNA-Proben unterschiedlichster Gewebe und Organismen hunderte von cDNA-Bibliotheken generiert. Solche sequenzierten cDNA-Klone werden ESTs – „expressed sequence tags“ – genannt (Fields C, 1994) und sind in zum Teil frei zugänglichen oder auch kommerziellen speziellen Datenbanken abgelegt. Mithilfe dieser Datenbanken, in denen Millionen solcher ESTs gespeichert sind, kann man sich relativ problemlos einen Überblick verschaffen, welche Gene in einem Gewebe oder Zelltyp eines Organismus unter bestimmten Bedingungen aktiv sind.

Eine relativ teure Methode zur Analyse differentieller Genexpression ist der Einsatz von DNA-Microarrays (Schena M, et al., 1995; Lockhart DJ, et al., 1996). Dabei handelt es sich um spezifische zweidimensional angeordnete Sammlungen von meist mehreren Tausend cDNA-Molekülen bestimmter Gewebe oder Zellarten, die an eine Nylon-Membran oder Glasoberfläche gekoppelt sind. Zur Untersuchung der Genexpression wird eine fluoreszenzmarkierte RNA-Probe mit dem Array hybridisiert und die Intensität des Signals an einer bestimmten Stelle des Arrays ist ein Maß für die Expression der entsprechenden DNA-Sequenz. Zur differentiellen Expressionsanalyse zum Beispiel von krankem und gesundem Gewebe kann man die Proben entweder nacheinander auftragen oder mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen parallel durchführen. Der Test mit DNA-Microarrays ist zum einen dadurch begrenzt, dass nur eine definierte Population von DNA-Sequenzen untersucht werden kann, das heißt, die interessierenden Gensequenzen müssen bereits bekannt sein, und zum anderen durch die unterschiedliche Qualität der Hybridisierung werden gering exprimierte mRNA-Spezies häufig übersehen.

Eine andere Methode zur Untersuchung der Genexpression und ihrer Quantifizierung ist die „Serielle Analyse der Genexpression“ (Serial analysis of gene expression, SAGE) (Velculescu VE, et al., 1995). Dabei wird mRNA zunächst in cDNA umgeschrieben, von jeder cDNA werden kurze aber charakteristische Sequenzen (sogenannte „tags“)

ausgeschnitten und diese Sequenzen werden ligiert und sequenziert. Die Sequenzanalyse gibt Aufschluss über Identität und Häufigkeit der charakteristischen Sequenzen.

Die sogenannte „differential-display-PCR“ (DD-PCR) ist ein weiteres Verfahren (Liang P, Pardee AB, 1992), um die mRNA in Geweben oder Zellarten unter verschiedenen Bedingungen zu analysieren und zu vergleichen.

In der zweiten Hälfte der 90er Jahre wurden verschiedene Untersuchungen unternommen, bei denen es um den Vergleich der mRNA-Mengen mit den Mengen der entsprechenden Proteine ging. Dabei wurde deutlich, dass die Analyse der mRNA für eine funktionelle Genomanalyse allein offenbar nicht ausreicht, da zwischen mRNA und Protein nur eine unzureichende Korrelation gefunden wurde. So haben N.L. Anderson und J. Seilhamer die mRNA- und Proteinmengen verschiedener zellulärer Genprodukte miteinander verglichen und einen Korrelationskoeffizienten von 0,48 gefunden (Anderson L, Seilhamer J, 1997). K.D. Tew et al. haben die Korrelation eines einzigen Proteins, der Glutathion-S-Transferase, in sechzig verschiedenen humanen Zelllinien im Vergleich zur exprimierten mRNA untersucht und einen Korrelationskoeffizienten der gleichen Größenordnung von 0,43 gefunden (Tew KD, et al., 1996). Bei diesen Untersuchungen konnten bei vergleichbaren Werten des jeweils entsprechenden anderen Parameters Schwankungen der Protein- oder mRNA-Mengen bis zum 10fachen beobachtet werden. In einer weiteren Veröffentlichung wurde auch an Hefezellen gezeigt, dass zwischen mRNA und Protein nur unzureichende Korrelation besteht (Gygi S, et al., 1999). Man kann also nicht zwingend von quantitativen Daten der mRNA auf die Expression des entsprechenden Proteins schließen.

Der Mangel an Korrelation zwischen mRNA und Protein kann auf verschiedene Phänomene zurückgeführt werden, die sowohl die RNA wie die Proteine betreffen. So können durch sogenanntes differentielles Spleißen einer RNA verschiedene Proteine translatiert werden. Zum Beispiel werden aus demselben Gen für das „cell adhesion molecule“ (CAM) durch differentielles Spleißen zwei unterschiedliche Isoformen produziert (Gower HJ, et al., 1988). Als weiteres noch deutlicheres Beispiel kann das tau-Protein dienen, das bei der Entstehung von Alzheimer eine wichtige Rolle spielt. Durch unterschiedliche Prozessierung des transkribierten RNA-Strangs können sechs verschiedene mRNA-Stränge entstehen. Die davon translatierten Proteine können wiederum verschiedene sogenannte post-translationale Modifikationen (PTM), ein weiteres Phänomen, das die mangelnde Korrelation zwischen RNA und Protein erklärt, erfahren, in diesem Fall hauptsächlich Phosphorylierungen, sodass es nicht nur ein einziges Genprodukt des tau-Gens gibt, sondern es sich bei einer 2D-PAGE in ca. 80 Proteinspots darstellt (Janke C, et al., 1996). Neben Phosphorylierungen sind Hydroxylierungen, Methylierungen und Glykosylierungen die häufigsten post-translationalen Modifikationen. Es sind bisher über 300 Aminosäuremodifikationen gefunden worden, sodass die mögliche Variabilität entsprechend hoch ist. Auch proteolytische Prozessierungen spielen unabhängig von der RNA-Expression eine Rolle zum Beispiel beim zielgerichteten Transport oder beim Abbau von Proteinen. Ein weiterer Umstand, auf den die mangelnde Korrelation von mRNA und Protein zurückzuführen sein kann, ist ihre unterschiedliche Stabilität. So ist RNA zum einen chemisch labiler, zum anderen kann sie leicht von ubiquitär vorhandenen

RNasen verdaut werden. R. Yolken und N. Johnston haben zum Beispiel gezeigt, dass die mRNA-Werte im menschlichen Hirn während der ersten 48 h *post mortem* um das ca. 200fache abfallen, während die Gesamtproteinmenge relativ konstant bleibt (Johnston NL, et al., 1997).

Der entscheidende Unterschied zwischen mRNA und Proteinen liegt in ihrer Funktion. Während mRNA gewissermaßen die Aufgabe des Informationstransfers von der DNA zum Protein hat, führen Proteine dagegen fast alle kontrollierten biologischen Funktionen aus, sind an allen wichtigen physiologischen Prozessen beteiligt, spielen entscheidende Rollen bei Krankheiten, Arzneimittelwirkungen und –nebenwirkungen etc. Die Messungen von mRNA sind daher bezüglich der Analyse der Funktionen von Genen nur indirekt, während Protein-Messungen direkten Bezug zu den funktionellen Mechanismen haben. Daher gewann die Analyse der Gesamtheit der Proteine, des Proteoms, in einem biologischen System in den letzten Jahren mehr und mehr an Bedeutung.

Ein technischer Quantensprung bei der Proteinidentifizierung war die Entwicklung von zwei „sanften“ Ionisierungsmethoden für die Massenspektrometrie (MS), die die massenspektrometrische Bestimmung von Peptiden ermöglichte. M. Karas und F. Hillenkamp veröffentlichten 1988 ihre Arbeiten zur „Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionisation-MS“ (MALDI-MS), während J.B. Fenn et al. ein Jahr später die Methode der „Elektrospray-Ionisation-MS“ (ESI-MS) publizierte (Karas M, Hillenkamp F, 1988; Fenn JB, et al., 1989). Während bisher ein Großteil der mithilfe einer 2D-PAGE aufgetrennten Proteine nicht identifiziert werden konnte, weil 75 % der Protein-Spots weniger als 500 femtomol Protein enthielten und damit für eine Edmann-Sequenzierung in zu geringen Mengen vorlagen, können nun die meisten Protein-Spots massenspektrometrisch identifiziert werden, da die neuen Verfahren um einiges sensitiver sind. So liegt die Sensitivität der Detektion von Peptiden bei einem MALDI-TOF(time-of-flight)-Massenspektrometer im zweistelligen Femtomol-Bereich (Vorm O, Mann M, 1994), während bei einem Tripel-Quadrupol- und Ionenfallen-MS mit ESI-Ionenquelle die Sensitivität schon im Attomol-Bereich liegen kann (Figeys D, et al., 1996). Diese Entwicklungen in der Massenspektrometrie machten die Erforschung der Proteine wieder populär und praktikabel. Zur Proteinidentifikation ist die Massenspektrometrie nun das bevorzugte Verfahren. Damit können nicht nur Proteine identifiziert, sondern im gewissen Rahmen auch ihre Modifikationen charakterisiert werden, indem die Massen der möglichen Modifikationen, wie zum Beispiel ein Phosphatrest, beim Vergleich der Massen mit Daten aus Datenbanken berücksichtigt werden (Williams KL, 1999).

1.3.3. Die Proteomanalyse

N.L. Anderson und N.G. Anderson definieren Proteomforschung als die Anwendung von Messungen der Genexpression auf Proteinebene, um biologische Prozesse (z. B. krankhafte Prozesse, Arzneimittelwirkungen etc.) zu charakterisieren und die Mechanismen der

Genexpressionskontrolle zu entschlüsseln (Anderson NL, Anderson NG, 1998). Während ein Genom vergleichsweise statisch ist, verhält sich ein Proteom höchst dynamisch. Es gibt nicht nur ein einziges Proteom, sondern viele verschiedene, die sich bezüglich des physiologischen Zustands innerhalb eines biologischen Systems voneinander unterscheiden. Es werden zu keinem Zeitpunkt und in keiner Zelle jemals alle vom Genom determinierten Proteine exprimiert, sondern das Protein-Muster eines Organismus, einer Zellart oder eines Gewebes variiert in Abhängigkeit einer Reihe von Parametern. So werden die Expressionsraten der Proteine neben der zellspezifischen Expression durch Umgebungsbedingungen wie Temperatur, Nährstoffangebot, Stressfaktoren und Wirkstoffexposition, durch den physiologischen Zustand, zum Beispiel die Position im Zellzyklus oder die Stoffwechsellage, oder durch pathologische Prozesse beeinflusst (Abb. 1.6). Eine Proteomanalyse bietet sozusagen jeweils nur einen Schnappschuss der funktionalen Produkte des entsprechenden Genoms.

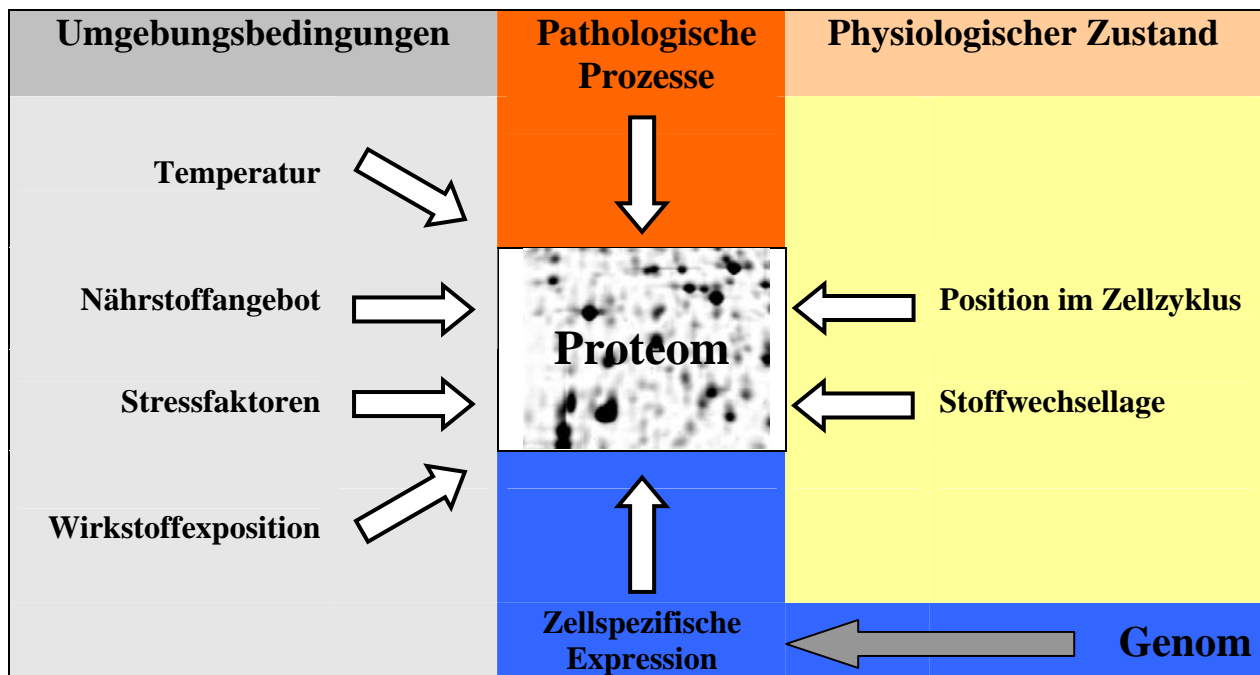
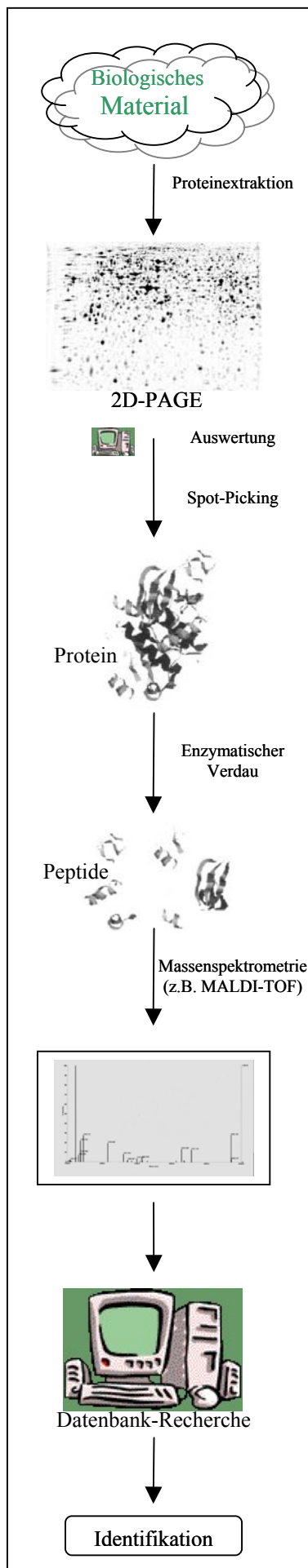


Abb. 1.6: Verschiedene Parameter nehmen Einfluss auf ein Proteom. Ein Proteom ist nicht wie das Genom eine mehr oder weniger statische Größe, sondern ist höchst dynamisch und von unterschiedlichen Faktoren abhängig.

Bei einer differentiellen Proteomanalyse geht es darum, zwei unterschiedliche Zustände einer Zellart, eines Gewebes oder eines Organismus miteinander zu vergleichen. Dabei ist es unumgänglich, dass alle weiteren möglichen Parameter, die Einfluss auf das Proteom haben können, für die gesamte Analyse unter standardisierten Bedingungen gleich bleiben.



Eine Proteomanalyse hat leider auch ihre Grenzen. So gibt es für Untersuchungen des Proteoms keine Amplifizierungstechnik wie die PCR-Technik für DNA- und RNA-Analysen, sodass es eine Frage der Sensitivität der Detektionsmethode ist, ob gering exprimierte Proteine analysiert werden können. Es gibt allerdings keine Detektionsmethode, die so sensitiv ist, dass alle exprimierten Proteine dargestellt werden können, da viele Proteine, gerade auch solche, die für Regulationsmechanismen wichtig sind, wie zum Beispiel Rezeptoren, nur in geringen Konzentrationen (typischerweise < 100 Kopien/Zelle) vorkommen. Zwei weitere Probleme liegen in der Natur der Proteine. So gibt es einerseits Proteine, besonders Membranproteine, die so hydrophob sind, dass sie kaum in Lösung gebracht, oder über den Verlauf der Proteomanalyse in Lösung gehalten werden können. Andererseits gibt es Proteine, die einen so sauren oder so basischen isoelektrischen Punkt (pI) haben, dass sie mit der Methode der 2D-PAGE nicht aufgelöst werden können.

Eine typische Proteomanalyse kann in unterschiedliche Schritte eingeteilt werden (Abb. 1.7). Zunächst müssen die Proteine aus dem zu untersuchenden biologischen Material extrahiert und nach Möglichkeit komplett solubilisiert werden. Anschließend werden die Proteine in einer zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE) nach zwei unterschiedlichen Kriterien aufgetrennt: (1) nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) und (2) nach ihrem Molekulargewicht. Diese Technik, die, wie bereits erwähnt, von J. Klose und P.H. O'Farrel entwickelt wurde (O'Farrell PH, 1975; Klose J, 1975), erlaubt es, in einem Versuchsdurchgang im Regelfall 1000 – 2000 Proteine aufzutrennen. J. Klose und U. Kobalz ist es sogar gelungen, mit 46 cm x 30 cm großen Gelen über 10.000 Polypeptide zu separieren (Klose J, Kobalz U, 1995). Die 2D-PAGE ist bis heute die effizienteste Methode, um komplexe Proteingemische aufzutrennen. Nach dem Auftrennen der Proteine werden die Polyacrylamidgele angefärbt (Silbernitrat, Coomassie Brilliantblau, etc.), die Protein-Muster densitometrisch erfasst und mit einer entsprechenden Software

Abb. 1.7: Verlauf einer Proteomanalyse

analysiert. Die interessierenden sogenannten Protein-Spots werden manuell oder maschinell ausgeschnitten („Spot-Picking“), mit einem spezifischen Enzym (im Normalfall Trypsin) verdaut und die erhaltenen Peptide massenspektrometrisch analysiert. Für diese Aufgabe können generell zwei mögliche massenspektrometrische Verfahren zur Anwendung kommen. Ein „Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionisation-Massenspektrometer“ (MALDI-MS) erlaubt die gleichzeitige Messung der Peptidmassen des verdauten Proteins mit hoher Präzision (Karas M, Hillenkamp F, 1988). Die erhaltene Liste der Peptidmassen wird „peptide-mass fingerprint“ (PMF) genannt. Diese experimentell erhaltenen Peptidmassen werden mit theoretischen Massen aus Proteindatenbanken verglichen, die man bei einem Verdau mit dem entsprechenden Enzym erhalten würde. Ein Großteil der Proteine lässt sich so mit einer hohen Wahrscheinlichkeit identifizieren. Ist ein Protein in den Proteindatenbanken nicht enthalten, kann auf einen immer größer werdenden Pool an Daten aus der Genomforschung, besonders aus dem Humangenom-Projekt (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001), zurückgegriffen werden, um das unbekannte Protein einer Proteinfamilie und der Lokalisation des zugehörigen Gens zuzuordnen. Dabei wird unter Verwendung der genetischen Codes aus bekannten DNA-Sequenzen die codierte Aminosäuresequenz generiert und die theoretisch errechneten PMFs nach enzymatischem Verdau mit den experimentell ermittelten Daten verglichen (Abb. 1.8). Eine andere Methode ist die „Elektrospray-Ionisation-Tandem-MS“ (ESI-MS-MS), die eine Sequenzierung der nach Verdau erhaltenen Peptide ermöglicht (Fenn JB, et al., 1989).

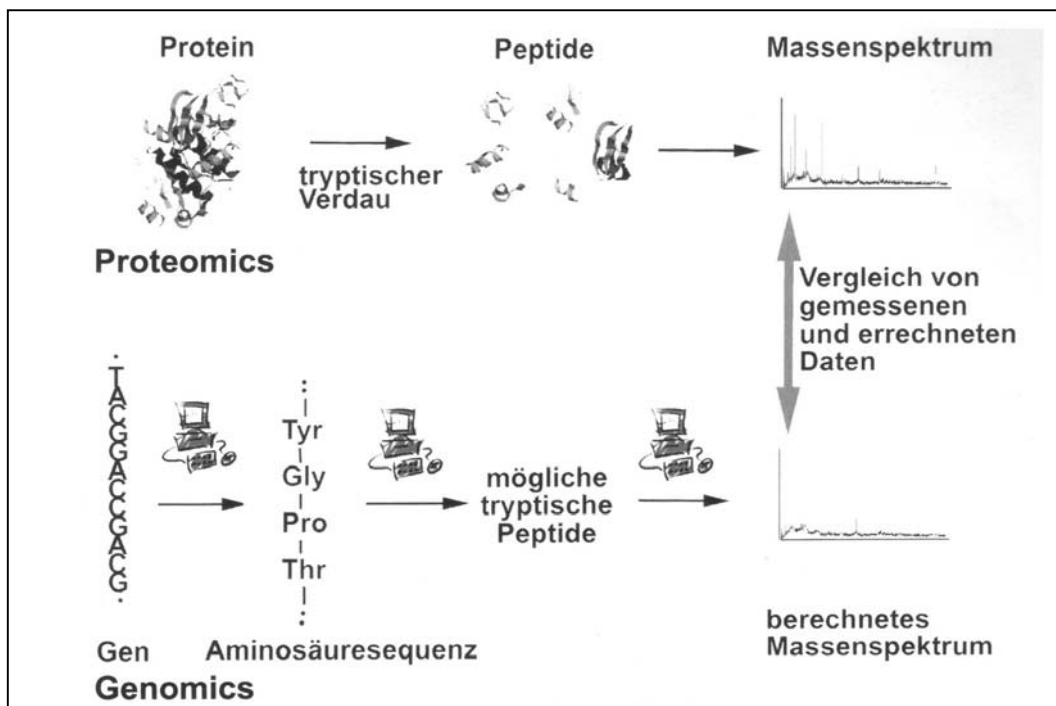


Abb. 1.8: Vergleich von gemessenen und theoretischen Daten eines tryptischen Verdau (aus Schrattenholz A (Hrsg.), Methoden der Proteomforschung, 2001)

In der Literatur findet man unterschiedliche Einteilungen der Proteomforschung in Unterdisziplinen. So unterscheidet W.P. Blackstock zwei Richtungen, auf der einen Seite „Expression Proteomics“ und auf der anderen Seite „Functional Proteomics“ (Blackstock WP, Weir MP, 1999). Dabei zielt Expression Proteomics, oder die Proteomforschung der Expression, darauf ab, alle exprimierten Proteine einer Zellart, eines Gewebes oder eines Organismus systematisch nach ihrer Qualität und Quantität zu erfassen. Das Ziel von Functional Proteomics, oder funktionale Proteomforschung, ist es, die Proteine zu erfassen, die aufgrund natürlicher oder manipulierter Einflüsse Änderungen erfahren. Dazu gehören zum Beispiel pharmakologische, toxikologische oder entwicklungsphysiologische Untersuchungen.

Die Proteomforschung kann auch etwas genauer in vier Forschungsrichtungen unterteilt werden:

- Die molekulare Anatomie, bei der die Proteinzusammensetzung von Zellen, Geweben und Organismen untersucht wird.
- Die molekulare Pathologie, die sich mit Änderungen der Proteinexpression und -modifikation bei Krankheiten beschäftigt.
- Die molekulare Pharmakologie und Toxikologie, die die Effekte von Wirkstoffen auf Expression und Modifikation der Proteine beobachtet.
- Und die molekulare Physiologie, die sich mit der differentiellen Proteinexpression und -modifikation in Abhängigkeit zur Mikro- und Makroumgebung beschäftigt (James P, 1997).

In der Pharmakologie wird die Proteomforschung angewendet, um Wirkungen, Nebenwirkungen, Toxizitäten und Resistenzen von Medikamenten zu untersuchen. Außerdem ist sie sehr geeignet, um neue Targets für Wirkstoffe zu finden und zu untersuchen. Diese Anwendungen der Proteomforschung unter pharmakologischen Gesichtspunkten wird auch unter dem Begriff „Pharmacoproteomics“ oder Pharmakoproteomforschung zusammengefasst (Chapal N, et al., 2004). Um diese Unterdisziplin der Proteomforschung soll es in der vorliegenden Arbeit gehen.

1.4. Zielsetzung

Am Anfang wurde bereits erwähnt, dass das Neuroblastom als ein typischer Tumor des Kleinkindes mit ca. 8 % aller kindlichen Krebserkrankungen der dritthäufigste Tumor im Kindesalter ist. Daher kommt der Erforschung des Neuroblastoms an der Kinderklinik eine zentrale Bedeutung zu, um einen Beitrag zur Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten zu leisten.

So sollte als neuer Ansatz für die Therapie des Neuroblastoms der Einfluss von NSAR auf Neuroblastomzellen untersucht werden, da ihre hemmende Wirkung auf die Tumorgenese verschiedener anderer Tumoren schon seit geraumer Zeit bekannt ist. Diese Wirkung ist, wie bereits beschrieben wurde, durch eine Fülle von epidemiologischen Studien, mithilfe einer ganzen Reihe von randomisierten Placebo-kontrollierten Studien und in vielen Tier- und Zell-Modellen hinreichend belegt worden. Außerdem sind viele Mechanismen beschrieben worden, durch die NSAR Einfluss nehmen auf Apoptose und Angiogenese und so das Wachstum von Tumoren hemmen (Kap. 1.2.2.). Dennoch ist der genaue Wirkmechanismus oder das Zusammenspiel der diskutierten Wirkmechanismen noch weitgehend ungeklärt.

Zunächst sollte die Wirkung verschiedener NSAR auf Vitalität und Proliferation der Neuroblastomzellen analysiert werden. Ziel dieser Versuche war es, die Konzentrationen zu ermitteln, durch die eindeutige Effekte zu beobachten waren. Außerdem sollten speziell morphologische und apoptotische Veränderungen unter NSAR-Einwirkung untersucht werden.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, anhand der Neuroblastomzellen mehr Klarheit über die Wirkmechanismen zu bekommen, durch die NSAR die Tumorgenese und Apoptose beeinflussen. Dabei sollten besonders Veränderungen auf Proteinebene untersucht werden, um speziell alternative Proteine zu finden, die bisher nicht im Zusammenhang mit der Wirkung von NSAR auf die Tumorgenese gesehen wurden und möglicherweise als neue pharmakologische Targets genutzt werden können. Daher waren Methoden der Proteomforschung zu etablieren, um mithilfe der differentiellen Proteomanalyse Proteine identifizieren zu können, die durch die Behandlung der Neuroblastomzellen mit NSAR herauf oder herab reguliert werden.

Die Expression interessanter Proteine sollte mit immunochemischen Methoden bestätigt und die Korrelation zwischen den ermittelten Proteinen und der jeweiligen mRNA-Expression untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. Zelllinie

Die Versuche dieser Arbeit wurden an einer humanen Neuroblastom-Zelllinie mit der Bezeichnung KELLY durchgeführt (Schwab M, et al., 1983; Preis PN, et al., 1988). Diese Zelllinie wurde von der „Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH“ (DSMZ) bezogen. Sie zeichnet sich durch eine ca. 100-fache Amplifikation des Oncogens N-Myc in homogen angefärbten Regionen (homogeneous-staining-regions, HSRs) aus. Aufgrund dieses molekulargenetischen Kriteriums steht die Zelllinie Kelly für einen Tumor mit aggressivem Wachstum und schlechter Prognose (Brodeur GM, 1994, Schwab M, 1994). Außerdem weist diese Neuroblastom-Zelllinie einen nahezu diploiden Chromosomensatz mit 20 % Polyploidie auf und ist damit späteren Stadien mit prognostisch ungünstigerem Verlauf zuzuordnen (Look AT, et al., 1984).

Kelly ist eine adhärente Zelllinie, die in Kulturflaschen, Petrischalen oder in 6- bis 96-Well-Platten als Monolayerkultur im Brutschrank angezüchtet wurde. Dabei wurde die Temperatur konstant bei 37°C gehalten. Die feuchte Atmosphäre hatte einen CO₂-Gehalt von 5 %.

2.1.2. Materialien und Chemikalien

Geräte und Materialien

Laminar Air Flow (LAF) (Steril-Werkbank)	LaminAir HL 2448	Heraeus
Wasserbad	Lauda	Wobser GmbH
Mikroskop	Leica DMIL	Leica
Pumpe		
Zentrifuge	Varifuge 3.0RS (Rotor #8074/8080, r (max): 21,1 cm)	Heraeus
Brutschrank	Function line	Heraeus
Pasteur-Pipetten		Hirschmann
Zählkammer nach Neubauer		Superior Marienfeld
Zellkulturflasche (80 cm ²)	Nunclon Surface	Nunc Brand Products
Zellkulturflasche (175 cm ²)	Nunclon Surface	Nunc Brand Products

Geräte und Materialien

Zellschaber, 32 cm		Nunc Brand Products
Falcon-Röhrchen 15 ml	Cellstar PP-Test tubes	Greiner bio-one
Falcon-Röhrchen 50 ml	Cellstar PP-Test tubes	Greiner bio-one

Lösungen und Chemikalien

Medium	500 ml	RPMI 1640	PAA Laboratories
<i>Zusätze:</i>	10 %	FCS	Sigma
	100 U/ml	Penicillin	PAA Laboratories
	100 µg/ml	Streptomycin	PAA Laboratories
PBS-Lösung	5,74 g	Na ₂ HPO ₄	Sigma
	39,74 g	NaCl	Sigma
	0,95 g	KH ₂ PO ₄	Merck
	0,95 g	KCl	Roth
	ad 5000 ml	MilliQ-H ₂ O	
<i>pH-Wert eingestellt auf 7,2</i>		Salzsäure 37%	Roth
		NaOH	Sigma
Trypsin-EDTA-	5 g	Trypsin	PAA Laboratories
Stammlösung (10-fach)	2 g	EDTA	PAA Laboratories
	ad 100 ml	NaCl 0,9 %-Lösung	
<i>à 10 ml aliquotiert</i>			Lagerung: – 20°C
Trypsin-EDTA-Lösung	10 ml	Trypsin-EDTA-Stammlösung (10-fach)	
(1-fach)	90 ml	PBS-Lösung	
Trypan-Blau-Lösung 0,5 %			PAA Laboratories
Waschpuffer	1,21 g	Tris-Base	10 mM Sigma
	85,575 g	Saccharose	250 mM Sigma
	ad 1000 ml	MilliQ-H ₂ O	
<i>pH-Wert eingestellt auf 7,3</i>		Salzsäure 37%	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)			Sigma
Ethanol absolut			Riedel-de Haën
Tris-Base-Puffer (1 M)	12,1 g	Tris-Base	Sigma
	ad 100 ml	MilliQ-H ₂ O	

Tris-HCl-Puffer (1 M)		Tris-HCl	Sigma
	ad 100 ml	MilliQ-H ₂ O	
Tris-Puffer pH 7,3 (1 M)	12,1 g	Tris-Base	Sigma
	ad 100 ml	MilliQ-H ₂ O	
<i>pH-Wert eingestellt auf 7,3</i>		Salzsäure 37%	Roth
Acetylsalicylsäure			Sigma
Flufenaminsäure			Sigma
Sulindac			Sigma

Dem Medium RPMI 1640 wurden vor der Verwendung die oben genannten Zusätze, die aliquotiert bei – 20°C gelagert wurden, zugefügt. Das FCS wurde zuvor 30 min bei 56°C inaktiviert. Das fertig zusammengesetzte Medium wurde im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

2.1.3. Umsetzen von Zellen

Die Zellen wurden alle 3 – 4 Tage passagiert. Nach dieser Zeit hatten sie im Normalfall eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht. Es wurden immer ca. 1×10^6 Zellen aus einer mittleren Kulturflasche, die eine Wachstumsfläche von 80 cm² hat, umgesetzt. Das Passagieren der Zellen erfolgte unter aseptischen Bedingungen in einer Laminar-Air-Flow-Werkbank.

- Zunächst wurde das alte Medium über eine Pasteur-Pipette mithilfe einer Membranpumpe abgesaugt.
- Die adhärennten Zellen wurden zweimal mit PBS-Lösung (37°C) gewaschen, die jeweils wieder abgesaugt wurde.
- Um die Zellen von der Gefäßwand der Kulturflasche abzulösen und aus dem Zellverband herauszulösen, wurde zu den gewaschen Zellen 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung gegeben. Die Inkubationsdauer betrug ca. 10 min bei Raumtemperatur.
- Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen durch Schwenken und Klopfen an die Seiten der Kulturflasche vollständig abgelöst und in Suspension gebracht. Zu dieser Zellsuspension wurden 5 ml frisches Medium gegeben, die Flaschenwand, an der die Zellen gewachsen waren, mehrmals damit abgespült und das gesamte Volumen in ein 14 ml-Falcon-Röhrchen überführt.
- Anschließend wurden die Zellen in der Zentrifuge mit 960 rpm bei 20°C über eine Dauer von 10 min zentrifugiert.

- Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Das entstandene Zellpellet wurde in 5 ml frischen Mediums aufgenommen und resuspendiert.
- Aus dieser Zellsuspension konnte die Zellzahl bestimmt werden (siehe unten!).
- Von der Zellsuspension wurden je nach Bedarf 0,5 ml (1:10) bis 1,0 ml (1:5) abgenommen (im Regelfall 1:10) und in eine mittlere Kulturflasche gegeben, in die schon vorher 25 ml frisches Medium vorgelegt wurden.
- Die Zellen wurden anschließend wieder in feuchter Atmosphäre mit 5 % CO₂-Gehalt bei konstanter Temperatur von 37°C gehalten.

2.1.4. *Bestimmung der Zellzahl*

- Die Zellsuspension, deren Zellzahl bestimmt werden sollte, wurde zunächst gut durchmischt. Zur Unterscheidung von vitalen und toten Zellen wurde ein kleines Volumen von ca. 20 µl mit Trypan-Blau-Lösung im Verhältnis 1 : 1 gemischt. Zur Routinezählung konnte auf den Zusatz von Trypan-Blau-Lösung verzichtet werden, weil die vitalen Zellen auch ohne Färbung leicht von den toten Zellen zu unterscheiden waren.
- Es wurde ein ausreichendes Volumen der Zellsuspension in die Zählkammer nach Neubauer pipettiert, sodass die Kammer genau gefüllt war.
- Anschließend wurden die Zellen in den vier großen Zählfeldern, die jeweils in sechszehn kleine Felder unterteilt sind, gezählt.
- Die Zählung wurde dreimal durchgeführt und der Mittelwert berechnet.

2.1.4.1. Zählkammer nach Neubauer

In einer Zählkammer sind vier große Zählfelder mit einer Fläche von je 1 mm². Diese Zählfelder sind noch mal jeweils in sechszehn kleinere Felder mit einer Fläche von je 0,0625 mm² unterteilt.

Daraus ergibt sich folgende Beziehung:

$$0,0625 \text{ mm}^2 \times 16 = 1 \text{ mm}^2$$

Die Zählkammer besitzt eine Höhe von 0,1 mm, sodass sich für ein Zählfeld ein Volumen von 0,1 mm³ ergibt:

$$1 \text{ mm}^2 \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3 = 1 \times 10^{-4} \text{ ml}$$

Für die Auszählung einer Zählkammer mit vier Zählfeldern mit je 1 x 10⁻⁴ ml Volumen ergibt sich folgende Zelldichte:

$4 \times \text{Zellen pro Z\ddot{a}hlfeld (1 mm}^2) \times 10^4 / \text{ml} = \text{Zellen / ml}$
--

Die ermittelte Zahl wird noch mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert:

$\text{Zelldichte} = 4 \times \text{Zellen pro Z\ddot{a}hlfeld (1 mm}^2) \times 10^4 / \text{ml} \times \text{Verdünnungsfaktor} = \text{Zellen / ml}$
--

2.1.5. *Wirkstoff- und Kontrolllösungen für die Behandlung der Zellen*

Flufenaminsäure-Lösungskonzentrat 100 mM:

Ansatz: 5 ml

- 140,6 mg Flufenaminsäure wurden in einem Gemisch aus 1 ml DMSO und 1 ml Ethanol abs. gelöst.
- Danach wurden erst 0,5 ml Tris-Base-Puffer (1 M) und anschließend langsam 0,5 ml Tris-HCl-Puffer (1 M) hinzugefügt.
- Daraufhin wurde mit Salzsäure 37 % ein pH-Wert von 7,3 eingestellt und mit Tris-Puffer pH 7,3 (1 M) auf 5 ml aufgefüllt.
- Die fertige Lösung wurde sterilfiltriert, zu 500 µl aliquotiert und bei –20°C gelagert.
- Die Kontrolllösung wurde genauso ohne Flufenaminsäure hergestellt.

Sulindac-Lösungskonzentrat 100 mM:

Ansatz: 5 ml

- 178,2 mg Sulindac wurden wie für Flufenaminsäure beschrieben in DMSO, Ethanol abs. und Tris-Puffer pH 7,3 (1 M) gelöst.

Acetylsalicylsäure-Lösungskonzentrat 100 mM:

Ansatz: 5 ml

- 90 mg Acetylsalicylsäure wurden ebenfalls wie Flufenaminsäure in DMSO, Ethanol abs. und Tris-Puffer pH 7,3 (1 M) gelöst.

2.1.6. Zellstimulation mit Wirkstoff zur Untersuchung der Proteinexpression

Zellen, deren Proteinexpression mithilfe der zweidimensionalen Elektrophorese untersucht werden sollten, wurden in großen Zellkulturflaschen (175 cm²) angesetzt. Dafür wurden für jede Flasche ca. 2×10^6 Zellen in 30 ml Medium eingesetzt. Bis zum Erreichen einer Konfluenz von ca. 80 %, was normalerweise nach ca. 72 h der Fall war, wurden die Zellen alle 24 h mit PBS-Lösung (37°C) gewaschen und mit neuem Medium versetzt.

- Bei einer Konfluenz von ca. 80 % konnten die Zellen mit Wirkstoff stimuliert werden.
- Zunächst wurde dafür das entsprechende Volumen des Wirkstoff-Konzentrats zu 30 ml Medium pro Kulturflasche gegeben, um die gewünschte Zielkonzentration zu erreichen. Für die Kontrollen wurde das Medium mit dem entsprechenden Volumen des Lösungsmittelpuffers des Wirkstoff-Konzentrats versetzt, um Unterschiede der Proteinexpression aufgrund des Lösungsmittels auszuschließen.
- Nach der Vorbereitung des Mediums (37°C) wurde zunächst das alte Medium abgesaugt.
- Die adhärennten Zellen wurden dann zweimal mit 25 ml PBS-Lösung (37°C) gewaschen und das mit Wirkstoff bzw. Lösungsmittelpuffer versetzte Medium auf die Zellen gegeben.
- Für die Zeit der Inkubation wurden die Zellen wieder in den Brutschrank gestellt.
- Nach Ablauf der Inkubationszeit konnten die Zellen geerntet werden.

2.1.7. Ernten von Zellen

- Schon während der Inkubationszeit der Zellen sollten die PBS-Lösung und der Waschpuffer im Eisbad ca. eine halbe Stunde vorkühlen. Ebenso sollte die Zentrifuge auf 4°C heruntergekühlt werden.
- Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen zunächst je zweimal mit 20 ml PBS-Lösung (37°C) gewaschen.
- Anschließend wurde in jede Kulturflasche 40 ml kalte PBS-Lösung (4°C) gegeben und auf Eis gestellt.
- Dann wurden die Zellen mit einem Zellschaber vorsichtig in gleichmäßigen Bewegungen von der Flaschenwand abgelöst.
- Die erhaltene Zellsuspension wurde in ein Falcon-Röhrchen (50 ml) überführt und in der Zentrifuge über eine Dauer von 10 min bei 4°C und 2300 rpm zentrifugiert.
- Der Überstand wurde verworfen und das entstandene Zellpellet zum Waschen mit 2 ml PBS-Lösung (4°C) resuspendiert und die Zellsuspension wieder auf 40 ml aufgefüllt. Dann wurde wieder 10 min bei 4°C und 2300 rpm zentrifugiert.

- Der Überstand wurde wieder verworfen und möglichst alles PBS vom Zellpellet entfernt.
- Das Zellpellet wurde anschließend in 2 ml elektrolytfreiem Waschpuffer resuspendiert, die Zellsuspension in ein Falcon-Röhrchen (15 ml) überführt und mit Waschpuffer auf 14 ml aufgefüllt.
- Danach wurde die entstandene Zellsuspension 5 min bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen und das Pellet möglichst von allen Waschpuffer-Resten befreit, da das Zellpellet möglichst trocken sein sollte.
- Anschließend wurden die geernteten Zellen sofort bis zur weiteren Bearbeitung bei – 80°C gelagert oder direkt die Proteinextraktion angeschlossen.

2.2. MTT-Test

2.2.1. Überblick

Der MTT-Test ist ein quantitativer kolorimetrischer Test zur Messung der Vitalität und Proliferation von Zellen (Mosmann T, 1983). Der Test beruht auf der Fähigkeit lebender Zellen, entsprechend ihrer Aktivität den gelben Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in Mitochondrien durch das Enzym Succinat-Dehydrogenase in ein unlösliches tiefblaues Formazan-Produkt zu reduzieren. Diese Reaktion läuft nicht in den Mitochondrien oder zellulären Trümmern toter Zellen ab (Carmichael J, et al., 1987). Durch die Messung der optischen Dichte (OD) erhält man ein Signal, das vom Grad der Aktivität der untersuchten Zellpopulation abhängig ist.

2.2.2. Materialien und Chemikalien

Geräte und Materialien

ELISA- Messgerät	vmax kinetic microplate reader	Molecular Devices
Microplatte 96 Wells		Greiner Labortechnik
Zentrifuge	Varifuge 3.0RS (Rotor #8074/8080, r (max): 21,1 cm)	Heraeus
Brutschrank	Function line	Heraeus
Schüttler	Titramax 100	Heidolph

Lösungen und Chemikalien

Medium	500 ml	RPMI 1640	PAA Laboratories
Zusätze:	10 %	FCS	Sigma
	100 U/ml	Penicillin	PAA Laboratories
	100 µg/ml	Streptomycin	PAA Laboratories
MTT-Lösung	40 mg ad 10 ml	MTT MilliQ-H ₂ O	Sigma
Stopp-Lösung	500 µl ad 10 ml	Ameisensäure Isopropanol 100 %	Merck Merck

2.2.3. Durchführung des MTT-Tests

- Ca. 8000 Zellen der Neuroblastom-Zelllinie Kelly wurden pro Well in einer 96-Well-Mikrotiterplatte mit je 200 µl Medium angesetzt.
- Bei einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zellen mit einem potentiell zytotoxischen Wirkstoff in verschiedenen Konzentrationen über einen bestimmten Zeitraum behandelt.
- Nach der Zellinkubation wurde in jedes Well 20 µl der frisch angesetzten MTT-Lösung gegeben.
- Daraufhin wurden die Zellen noch mal 4 h im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.
- Nach dieser Inkubationszeit wurde die 96-Well-Mikrotiterplatte bei 960 rpm und 20°C über 10 min in der Zentrifuge zentrifugiert.
- Das Medium wurde vorsichtig aus den Wells abgesaugt und durch 200 µl der Stopp-Lösung ersetzt.
- Die 96-Well-Mikrotiterplatte wurde danach 30 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler geschüttelt, um das kristalline blaue Formazan-Produkt zu lösen.
- Anschließend wurde die Optische Dichte (OD) der einzelnen Wells bei einer Wellenlänge von 595 nm im ELISA-Reader gemessen.

2.3. Apoptose-Test durch Acridinorange-/ Ethidiumbromidfärbung

2.3.1. Überblick

Dieser Test beruht auf der unterschiedlichen Aufnahme der DNA-Fluoreszenzfarbstoffe Acridinorange und Ethidiumbromid in Zellen. Während Acridinorange durch intakte Zellmembranen in lebende Zellen eindringen kann, kann Ethidiumbromid nur die DNA von Zellen mit nicht mehr intakter poröser Zellmembran färben. Acridinorange interkaliert in doppelsträngiger DNA und fluoresziert dann grün. Ethidiumbromid lagert sich ebenfalls in DNA ein und fluoresziert dann orange, wobei es die grüne Fluoreszenz von Acridinorange überdeckt. Bei gleichzeitiger Färbung einer Zellprobe mit beiden Farbstoffen kann man aufgrund der Färbung und der Morphologie lebende Zellen von apoptotischen und nekrotischen Zellen unterscheiden (Mercille S, Massie B, 1994):

1. Lebende Zellen (L) mit normalem Zellkern: leuchtend grünes Chromatin, nicht kondensiert.
2. Lebende apoptotische Zellen (LA): leuchtend grünes Chromatin, kondensiert oder fragmentiert, tiefe Ein- und Ausstülpungen der Zellmembran („Blebbing“).
3. Tote apoptotische Zellen (TA): leuchtend oranges Chromatin, stark kondensiert oder fragmentiert, tiefe Ein- und Ausstülpungen der Zellmembran („Blebbing“).
4. Tote nekrotische Zellen (TN): durchgehend orange gefärbte Zellen.

2.3.2. Materialien und Chemikalien

Geräte und Materialien

6-Well-Platte		Greiner Labortechnik
Zentrifuge	Biofuge fresco (Rotor #3765, r (max): 7,3 cm)	Heraeus
Brutschrank	Function line	Heraeus
Fluoreszenz-Mikroskop	DMRB	Leica
Kamera	RT Spot	Visitron Systems
Computer	PC	Hewlett Packard

Software

Spot Basic/Advanced	Visitron Systems
---------------------	------------------

Lösungen und Chemikalien

Medium	500 ml	RPMI 1640	PAA Laboratories
Zusätze:	10 %	FCS	Sigma
	100 U/ml	Penicillin	PAA Laboratories
	100 µg/ml	Streptomycin	PAA Laboratories
PBS-Lösung	5,74 g	Na ₂ HPO ₄	Sigma
	39,74 g	NaCl	Sigma
	0,95 g	KH ₂ PO ₄	Merck
	0,95 g	KCl	Roth
	ad 5000 ml	MilliQ-H ₂ O	
pH-Wert eingestellt auf 7,2		Salzsäure 37%	Roth
		NaOH	Sigma
Trypsin-EDTA-Stammlösung	5 g	Trypsin	PAA Laboratories
(10-fach)	2 g	EDTA	PAA Laboratories
	ad 100 ml	NaCl 0,9 %-Lösung	
á 10 ml aliquotiert			Lagerung: -20°C
Trypsin-EDTA-Lösung	10 ml	Trypsin-EDTA-	
(1-fach)		Stammlösung (10-fach)	
	90 ml	PBS-Lösung	
Acridinorange/Ethidiumbromid-		Acridinorange	Sigma
Stammlösung		Ethidiumbromid	Sigma

2.3.3. Durchführung des Acridinorange/Ethidiumbromid-Apoptose-Tests

- Ca. 6×10^4 Zellen der Neuroblastom-Zelllinie KELLY wurden pro Well in einer 6-Well-Platte mit je 1,5 ml Medium angesetzt.
- Bei einer Konfluenz von ca. 80 % (nach ca. 72 h) wurden die Zellen mit dem potentiell zytotoxischen Wirkstoff in verschiedenen Konzentrationen über eine bestimmte Zeit behandelt.
- Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen und aufbewahrt.
- Anschließend wurden die adhärenenten Zellen mithilfe von Trypsin/EDTA abgelöst, mit dem Überstand vereinigt und über 2 min bei 2000 rpm (Tischzentrifuge) zentrifugiert.
- Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet einmal mit PBS-Lösung gewaschen.

- Die Zellen eines Wells wurden in jeweils 25 µl Medium vorsichtig resuspendiert und direkt vor der mikroskopischen Betrachtung mit 2 µl Acridinorange-/Ethidiumbromidlösung (je 50 µg/ml) versetzt und kurz (ca. 1 min) inkubiert.
- Daraufhin wurden jeweils 20 µl dieser Zellsuspension auf einen Objektträger aufgetragen, mit einem Deckgläschen bedeckt und direkt (innerhalb von ca. 30 min) am Fluoreszenzmikroskop nach oben aufgeführten Kriterien ausgewertet. Dabei war zu beachten, dass pro Probe mindestens drei verschiedene Areale gleicher Größe ausgezählt wurden.
- Die Auswertung der Proben erfolgte nach folgender Formel:

$$\%L = \frac{L}{(L + LA + TA + TN)} \times 100 \text{ (entsprechend für LA, TA und TN)}$$

2.4. FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorting) des DNA-Gehalts von Zellen

2.4.1. Allgemeines

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS, fluorescence activated cell sorting) wurde in den späten 60er Jahren von W.A. Bonner, H.R. Hulett, R.G. Sweet und L.A. Herzenberg entwickelt (Bonner WA, et al., 1972). Es ist ein durchflusszytometrisches Verfahren, bei dem Zellen, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, in einem Flüssigkeitsstrom gezählt, ihre Größe und bestimmte molekulare Eigenschaften analysiert werden können. Die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe (Tab. 2.1) werden durch einen Argon-Ionen-Laser (488 nm) zur Emission von Licht definierter Wellenlänge angeregt, das dann mit spezifischen Detektoren nach elektronischer Verstärkung durch Photomultiplier (PMT) erfasst wird.

Fluoreszenzfarbstoff	Emissionsmaximum (nm)	Bezeichnung
APC-Cy7	767	PharRed
Fluoresceinisothiozyanat	519	FITC
PE-Cy5	670	CyChrome, Red670
PerCP	675	Peridi Chlorophyll
Phycoerythrin	578	PE
Propidiumjodid	650	PI
Red613	613	PE-TexasRed

Tab. 2.1: Einige für die FACS-Analyse häufig eingesetzte Fluoreszenzfarbstoffe und ihre Emissionsmaxima. Die unterschiedlichen Emissionsmaxima ermöglichen den parallelen Einsatz mehrerer Farbstoffe.

Da diese Messungen auf Einzelzellebene durchgeführt werden, ist es für die Aufarbeitung der Proben besonders wichtig, dass man eine Einzelzellsuspension erhält, die möglichst wenige Dupletts, Tripletts etc. aufweist. Außerdem sollten die Zellen aus verschiedenen Gründen fixiert werden:

1. Biologisch bedenkliche Proben können so unschädlich gemacht werden.
2. Zellproben können über einen längeren Zeitraum haltbar gemacht werden.
3. Nach der Probennahme wird eine unkontrollierte *in vitro* Aktivierung der Zellen unterbunden.
4. Zellen werden für eine intrazelluläre Protein-, Antigen- oder DNA-Messung permeabel gemacht.
5. Degradierete DNA apoptotischer Zellen wird für die FACS-Analyse ausgewaschen.

Jede Zelle wird im Messbereich durch ein aufwendiges Flüssigkeitssystem „hydrodynamisch fokussiert“ und einzeln durch den Laserstrahl geführt. Dabei wird die Zellsuspension unter Druck in einer Stahlkapillare zu einer sich konisch verengenden Quarzküvette geleitet. Die Stahlkapillare ist auf das Zentrum der Küvette gerichtet und wird mit hoher Geschwindigkeit von einer zellfreien Flüssigkeit, dem sogenannten Hüllstrom, umspült. Am Ende der Stahlkapillare wird die Zellflüssigkeit vom Hüllstrom beschleunigt und so die Zellen in einem laminaren Fluss vereinzelt, so dass sie wie an einer Perlenkette durch die Küvette fließen und einzeln in schneller Abfolge vermessen werden können.

Neben der Intensität der Fluoreszenz misst ein FACS-Gerät auch die Streuung des Laserlichts. Dabei werden zwei Arten von Streulicht unterschieden. Die Streuung im Winkel von 0° bis 10° , genannt Forward-Scatter (FSC), ist ein Maß für die Zellgröße, während die Ablenkung des Lichts im 90° -Winkel als Side-Scatter (SSC) bezeichnet wird und grob die Granularität und intrazelluläre Struktur der Zelle charakterisiert.

Durch ein komplexes optisches System, das aus Blenden, Spiegeln und unterschiedlichen Filtern besteht, wird das Streulicht vom Fluoreszenzlicht getrennt und dieses wiederum in verschiedene Farbbereiche aufgeteilt, in denen die unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffe detektiert werden.

Häufig werden mithilfe der FACS-Analyse Oberflächenmoleküle und intrazelluläre Proteine quantitativ bestimmt. Grundlage einer solchen Analyse ist die direkte oder indirekte Anlagerung eines fluorochrom-konjugierten Antikörpers an ein Oberflächenantigen oder intrazelluläres Protein. Da viele Zellpopulationen nur über eine Koexpression mehrerer Antigene identifizierbar sind, wird häufig mit Antikörperkombinationen gearbeitet, an die verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe konjugiert sind. Die so erfassten Fluoreszenzintensitäten korrelieren mit der Antigenmenge des untersuchten Proteins pro Zelle.

Als weitere Möglichkeit bietet die FACS-Analyse die Untersuchung des DNA-Gehalts. Dafür wird als Fluoreszenzfarbstoff Propidiumjodid (PI) eingesetzt, der sich in die DNA-Helix einlagert. PI interkaliert stöchiometrisch, sodass der DNA-Gehalt direkt über die Fluoreszenzintensität ermittelt werden kann. Diese DNA-Gehaltsmessung gibt zum einen Aufschluss über die Verteilung der verschiedenen Phasen des Zellzyklus (Abb. 2.1) in einer Zellpopulation und zum anderen kann der Anteil der apoptotischen Zellen bestimmt werden:

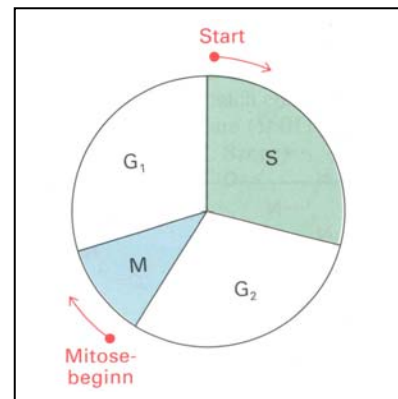


Abb.2.1: Schematische Darstellung des Zellzyklus: Synthese-Phase (S), G₂-Phase (gap = Lücke), Mitose-Phase (M) und G₁-Phase (aus Stryer L, 1999).

- G₀/G₁-Phase: In dieser Phase besitzt eine Zelle einen einfachen diploiden DNA-Gehalt, weil es der Zeitraum zwischen der letzten mitotischen Zellteilung und dem Beginn einer erneuten DNA-Synthese ist.

- S-Phase: In der Synthese-Phase ist durch die DNA-Replikation ein kontinuierlicher Anstieg des DNA-Gehalts zu beobachten, bis der doppelte diploide DNA-Gehalt erreicht ist.
- G₂/M-Phase: In der G₂-Phase verändert sich der DNA-Gehalt zunächst nicht, da die Zelle nach Abschluss der Synthese-Phase mitotisch aktive Enzyme produziert und postreplikative Reparaturmechanismen ablaufen. In der Mitose-Phase teilt sich die Zelle dann in zwei diploide Tochterzellen, die entweder in die Ruhephase G₀ oder in die G₁-Phase eines neuen Zellzyklus eintreten.
- Sub-G₁-Peak: Apoptotische Zellen zeichnen sich unter anderem durch extensives Schneiden der DNA zu kleinen DNA-Fragmenten aus. Diese degradierte DNA wird durch die Fixierung mit Ethanol oder Aceton, wodurch die Zellmembran permeabel wird, ausgewaschen, sodass der DNA-Gehalt geringer ist als bei vitalen Zellen und daher apoptotische Zellen im Histogramm einer FACS-Analyse im sogenannten Sub-G₁-Peak auftauchen (Darzynkiewicz Z, et al., 1992; Nicoletti I, et al., 1991; Elstein KH, Zucker RM, 1994; Elstein KH, et al., 1995).

2.4.2. *Probenvorbereitung für die FACS-Analyse*

Aus oben genannten Gründen wurden die behandelten Zellen für die DNA-Gehaltsbestimmung fixiert. Bei der Fixierung denaturieren, präzipitieren und vernetzen die Proteine und ihre Seitenketten, sodass das biologische Material bis zu einem gewissen Grad stabilisiert wird. Außerdem wird die Permeabilität der Zellmembranen erhöht, sodass einerseits das Zellinnere für Propidiumjodid zugänglich wird und andererseits für die Bestimmung des apoptotischen Anteils der Zellpopulation degradierte DNA aus den Zellen ausgewaschen werden kann.

2.4.2.1. **Materialien und Chemikalien**

Geräte und Materialien

Zentrifuge	Varifuge 3.0RS (Rotor #8074/8080, r (max): 21,1 cm)	Heraeus
Brutschrank	Function line	Heraeus

Lösungen und Chemikalien

Medium	500 ml	RPMI 1640	PAA Laboratories
Zusätze:	10 %	FCS	Sigma
	100 U/ml	Penicillin	PAA Laboratories
	100 µg/ml	Streptomycin	PAA Laboratories

PBS-Lösung	5,74 g	Na ₂ HPO ₄	Sigma
	39,74 g	NaCl	Sigma
	0,95 g	KH ₂ PO ₄	Merck
	0,95 g	KCl	Roth
	ad 5000 ml	MilliQ-H ₂ O	
<i>pH-Wert eingestellt auf 7,2</i>		Salzsäure 37%	Roth
		NaOH	Sigma
Ethanol absolut			Riedel-de Haën
RNase-Stammlösung (1 mg/ml)	10 mg	RNase	Sigma
	ad 10 ml	MilliQ-H ₂ O	
Propidiumjodid-Stammlösung (1 mg/ml)	5 mg	Propidiumjodid	Sigma
	ad 5 ml	MilliQ-H ₂ O	

2.4.2.2. Durchführung der Probenvorbereitung

- Ca. 2×10^5 Zellen der Neuroblastom-Zelllinie KELLY wurden in Petri-Schalen (\varnothing 5 cm) mit je 5 ml Medium angesetzt.
- Bei einer Konfluenz von ca. 80 % (nach ca. 72 h) wurden die Zellen mit einem potentiell zytotoxischen Wirkstoff in verschiedenen Konzentrationen über einen bestimmten Zeitraum behandelt.
- Nach Abschluss der Inkubationszeit wurden die Zellüberstände abgenommen und in 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt.
- Daraufhin wurden die Zellen 10 min mit Trypsin/EDTA-Lösung behandelt und so vom Untergrund und aus dem Zellverband gelöst.
- Die erhaltenen Zellsuspensionen wurden mit den entsprechenden Zellüberständen vereinigt und 5 min bei Raumtemperatur mit 2000 rpm zentrifugiert.
- Die erhaltenen Zellpellets wurden in je 0,5 ml eiskalter PBS-Lösung aufgenommen und resuspendiert.
- Anschließend wurden zu jeder Probe unter ständigem vorsichtigen Schütteln tropfenweise 1,5 ml Ethanol abs. (-20°C) hinzugefügt und sofort zur Fixierung über Nacht bei 4°C stehen gelassen.
- Danach wurden durch vorsichtiges Vortexen die Zellen, die sich an den Gefäßwänden angelagert hatten, wieder abgelöst und die Zellsuspensionen 5 min bei Raumtemperatur mit 2000 rpm zentrifugiert.
- Die Zellen wurden einmal mit PBS-Lösung gewaschen und noch mal zentrifugiert.

- Die erhaltenen Zellpellets wurden in 500 μ l RNase A in PBS aufgenommen (10 μ l RNase (1 mg/ml) in 1 ml PBS) und resuspendiert. Dann wurden sie mindestens 30 min, besser über Nacht, stehen gelassen.
- Zur Messung wurden die einzelnen Zellsuspensionen in spezielle Messgefäße des FACS-Geräts quantitativ überführt und mit 20 μ l Propidiumjodid-Stammlösung (1 mg/ml) versetzt.
- Nach 5 min Inkubationszeit konnte mit der Messung begonnen werden.

2.4.3. Messungen der Zellproben und ihre Auswertung

Zur Datenauswertung mit dem Programm CellQuest™ wird zunächst ein Aufnahmeschema erstellt. Als erster sogenannter Dotplot wird FSC gegen SSC aufgeführt (Abb. 2.2 (A)), wodurch man ein Maß für die Qualität und Integrität der Zellen bekommt. Dann wird im FL-2Area gegen FL-2Width-Dotplot im Bereich von Kanal 0 – 400 eine Region oder ein sogenanntes Gate R2 gesetzt, um Zelldupletts und –tripletts von der Analyse auszuschließen (Abb. 2.2 (B)). Schließlich werden im FL-2Area-Histogramm die Marker für die einzelnen Zellzyklusphasen der Zellen und für apoptotische Zellen (Sub-G₁) gesetzt (Abb. 2.2 (C)). Über die Histogramm-Statistik können dann die prozentualen Verteilungen berechnet werden.

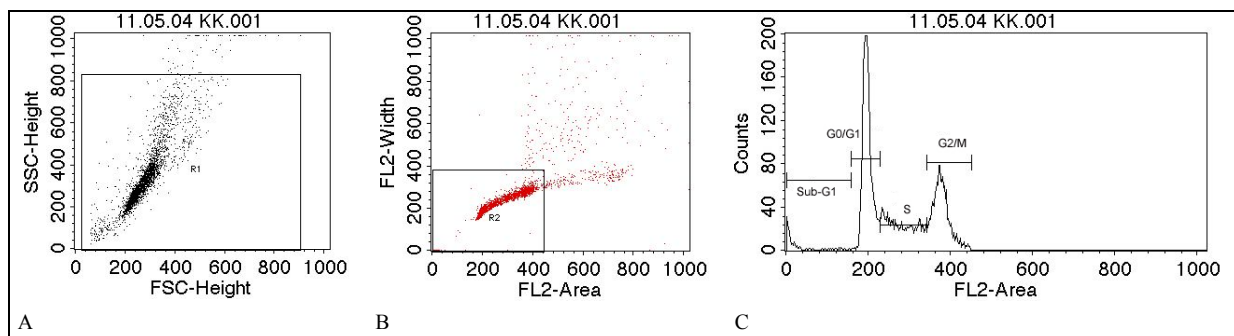


Abb. 2.2: (A) Die Abbildung von FSC/SSC gibt einen Hinweis darüber, wie die Qualität der Zellen ist. (B) Durch das Setzen des Gates R2 werden Zelldupletts und –tripletts von der Analyse ausgeschlossen. (C) Im FL-2Area-Histogramm werden Marker für die einzelnen Zellzyklus-Phasen gesetzt, mit deren Hilfe die Histogramm-Statistik die prozentualen Verteilungen berechnen kann.

2.4.3.1. Materialien und Chemikalien

Geräte und Materialien

FACS-Gerät	FACSCalibur	Becton Dickinson
Auswertungsprogramm	BD CellQuest™ Pro Version 5.1.1	Becton Dickinson

Lösungen und Chemikalien

Trägerflüssigkeit für Durchflusszytometer	BD FACSTFlow™	Becton Dickinson
--	---------------	------------------

2.4.3.2. Durchführung der FACS-Analyse

- Zunächst wurde das FACS-Gerät längere Zeit mit der zellfreien Trägerflüssigkeit gespült.
- Danach wurde ein Messgefäß mit einer Zellsuspension von unbehandelten Zellen in das FACS-Gerät eingesetzt und eine Messung gestartet. Während des Messvorgangs wurden die entsprechenden Feineinstellungen des Geräts vorgenommen, das Gate R2 gesetzt und der Peak für die G₀/G₁-Phase im FL-2Area-Histogramm auf Kanal 200 justiert.
- Anschließend wurden die einzelnen Messgefäße mit den vorbereiteten Zellproben in das FACS-Gerät eingesetzt und gemessen. Nach 10.000 im gesetzten Gate gemessenen Zellen wurde die Analyse automatisch beendet und die Ergebnisse vom Auswertungsprogramm CellQuest™ berechnet und entsprechend dargestellt.

2.5. Quantitative Bestimmung von Prostanoiden

Die quantitative Bestimmung der Prostanoiden Prostaglandin (PG) E₂, Thromboxan (Tx) B₂ und der F₂-Isoprostane wurde aus dem Zellmedium behandelter Zellen vorgenommen. Dafür wurden die Zellen wie in den Kapiteln „FACS-Analyse des DNA-Gehalts von Zellen“ und „RT-PCR“ beschrieben in Petrischalen (Ø 5 cm) angesetzt und nach Erreichen einer Konfluenz von ca. 80 % mit Wirkstoff über einen bestimmten Zeitraum behandelt. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurden 1 ml des zellfreien Überstandes abgenommen und bis zur Prostanoid-Bestimmung bei –80°C gelagert. Als Kontrolle diente das Zellmedium.

Die Prostanoiden wurden vom Eicosanoid-Labor der Kinderklinik des Universitätsklinikums Marburg unter der Leitung von H. Schweer massenspektrometrisch mithilfe eines mit einem Gaschromatographen gekoppelten Tripel-Quadrupol-Massenspektrometers (GC-MS/MS) bestimmt (Schweer H, et al., 1994; Schweer H, et al., 1997).

2.6. Quantitative Bestimmung von Proteinen

2.6.1. Überblick

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, Proteine quantitativ zu bestimmen. Als relativ einfache und vor allem schnelle Methode ist die direkte Messung der Extinktion bei 280 nm Wellenlänge zu nennen. Diese Bestimmung beruht auf der Absorption der aromatischen Aminosäuren Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan bei der genannten Wellenlänge. Die unterschiedlichen Anteile dieser drei Aminosäuren in den verschiedenen Proteinen bedingen molare Extinktionskoeffizienten (ϵ), die sich von Protein zu Protein oft stark unterscheiden, sodass diese Methode bei einem unbekannten Proteingemisch nur bedingt einsetzbar ist. Außerdem kann diese Art der Bestimmung nur bei gut gereinigten Proteinen durchgeführt werden, weil auch andere Zellbestandteile, wie zum Beispiel Nukleinsäuren, bei 280 nm absorbieren.

Die quantitative Bestimmung von Proteinen aus komplexen Mischungen und Rohextrakten wird im Regelfall mit klassischen Methoden, die auf spezifischen Farbreaktionen (colorimetrische Methoden) beruhen, durchgeführt. Eine übliche Methode ist der Lowry-Test (Lowry OH, et al., 1951), der allerdings gegenüber Detergenzien und reduzierenden Reagenzien relativ störanfällig ist.

Noch besser geeignet ist die Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford MM, 1976), weil diese Methode einfacher, sensitiver und weniger störanfällig ist. Das Prinzip dieses Tests ist eine spezifische Bindung des Triphenylmethan-Farbstoffes Coomassie Brilliantblau G über hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen bevorzugt an Argininresten sowie in geringerem Maße an einigen anderen basischen und aromatischen Aminosäureresten (Compton SJ, Jones CG, 1985).

Bei optimalen Bedingungen liegt die Nachweisgrenze dieser Proteinbestimmungsmethode im 1 ml-Assay unter 1 μ g Protein (Spector T, 1978; Read SM, Northcote DH, 1981).

In saurer Umgebung hat die freie protonierte, kationische Form von Coomassie-Brillantblau G ein Absorptionsmaximum von 470 nm (rot). Bindet der Farbstoff an Protein, wird die im Gleichgewicht mit der kationischen Form stehende anionische Form stabilisiert und das Absorptionsmaximum verschiebt sich zu einer Wellenlänge von 595 nm (blau) (Compton SJ, Jones CG, 1985). Der Extinktionskoeffizient des Farbstoff-Protein-Komplexes ist sehr viel größer, als der des freien Farbstoffes, sodass die Zunahme der Absorption bei 595 nm mit hoher Empfindlichkeit photometrisch gemessen werden kann.

2.6.2. Materialien und Chemikalien

Geräte und Materialien

Photometer	vmax kinetic microplate reader	Molecular Devices
Microplatte 96 Wells		Greiner Labortechnik
Schüttler	Titramax 100	Heidolph
Pipettierwanne		
8-fach Pipette 50 – 300 µl	Finnpipette Multichannel	Labsystems
Parafilm		American National Can

Lösungen und Chemikalien

Bio-Rad Protein-Assay				Bio-Rad
Albumin-Standard-Konzentrat	2,0 mg/ml			Pierce
Lyse-Puffer	9,61 g	Urea	8 M	Sigma
	800 mg	CHAPS	4 %	Sigma
	24,2 mg	Tris-Base	10 mM	Sigma
	23,95 mg	Pefabloc	5 mM	Merck
	ad 20 ml	MilliQ-H ₂ O		
á 1,5 ml aliquotiert				Lagerung: – 80°C
Vor Gebrauch :	1,5 ml Lyse-Puffer + 15 mg	DTT	1 %	Sigma

2.6.3. Proteinbestimmung nach Bradford

2.6.3.1. Herstellung des Proteinstandards

Das Albumin-Standard-Konzentrat hatte eine Konzentration von 2 mg/ml = 2 µg/µl. Aus diesem Konzentrat wurden fünf Verdünnungen mit den Konzentrationen von 10, 20, 30, 40 und 50 µg/ml hergestellt.

Ansatz: je 5ml

Albumin-Standard-Konzentrat [µl]	MilliQ-H ₂ O	Konzentration [µg/ml]
25	ad 5 ml	10
50	ad 5 ml	20
75	ad 5 ml	30
100	ad 5 ml	40
125	ad 5 ml	50

Die Proteinstandards wurden zu je 400 µl aliquotiert und bei –30°C gelagert.

2.6.3.2. Durchführung der Proteinbestimmung

- Zunächst wurde die in Lyse-Puffer gelöste Proteinprobe so mit MilliQ-H₂O verdünnt, dass man eine vermutete Konzentration in der Größenordnung von 30 – 80 µg/ml erhielt. Das hieß, dass zum Beispiel bei einer erwarteten Probenkonzentration von ca. 5 µg/µl Protein (eventuell in Vorproben ermittelt), die Proteinprobe im Verhältnis 1 : 100 zu verdünnen war.
- Der Lyse-Puffer wurde für die Leerprobe und für die weitere Verdünnung der Proteinprobe im gleichen Verhältnis wie die Proteinprobe mit MilliQ-H₂O verdünnt.
- Für die Ermittlung der Eichkurve wurden von den Albumin-Standard-Verdünnungen 10, 20, 30, 40 und 50 µg/ml jeweils zweimal 160 µl in die Wells der Mikrotiterplatte pipettiert. Als Leerwert wurden in zwei Wells noch je 160 µl MilliQ-H₂O pipettiert.
- Die Proben-Verdünnung wurde mit der entsprechenden Lyse-Puffer-Verdünnung wie folgt in je zwei Wells zur Doppelbestimmung weiter verdünnt:

Proben-Verdünnung	Lyse-Puffer-Verdünnung
80 µl	80 µl
120 µl	40 µl
160 µl	0 µl

- Als Leerwert für die Proben-Verdünnungsreihe wurden je 160 µl des entsprechend verdünnten Lyse-Puffers in jeweils zwei Wells pipettiert.
- Anschließend wurde zu jedem dieser 160 µl Ansätze 40 µl des Protein Assays von Bio-Rad pipettiert und auf dem Schüttler gut gemischt.
- Nach ca. 5 bis 10 min wurden die Extinktionen bei 595 nm im Photometer gemessen.
- Aus den Parallelansätzen der Albumin-Standard-Verdünnungen wurde die Eichkurve mit der Ausgleichsgeraden berechnet (Abb. 2.3).
- Mithilfe der Eichkurve wurden die Mittelwerte der drei Proben-Verdünnungen bestimmt. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Verdünnungsfaktoren wurden dann drei Werte für die Konzentration der Proteinprobe ermittelt, deren Mittelwert als Grundlage für die Berechnung der Proteinmenge für die eindimensionale und zweidimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (1D- und 2D-SDS-PAGE) genommen wurde.

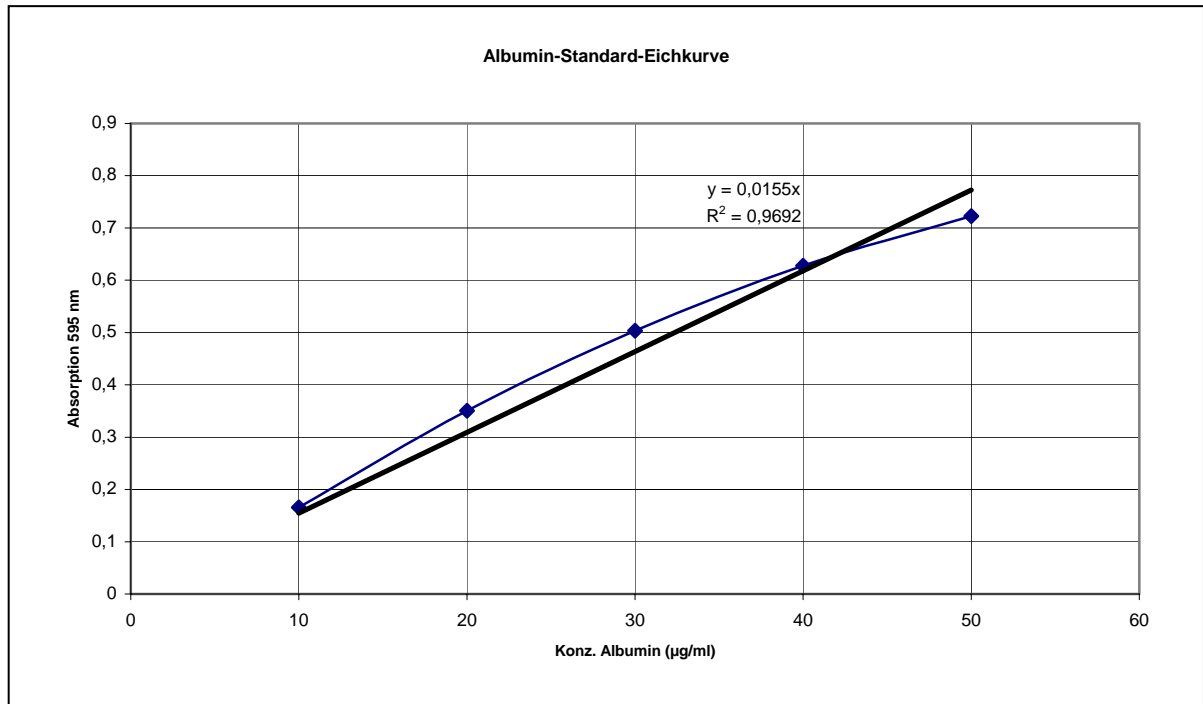


Abb. 2.3: Beispiel einer Eichkurve für eine Proteinbestimmung nach Bradford. Gemessen wurde die Absorption einer Verdünnungsreihe von 10 bis 50 µg/ml Albumin bei 595 nm.

2.7. Zweidimensionale Elektrophorese in der Proteomforschung

2.7.1. Allgemeine Grundlagen

In der Proteomforschung ist für die Analyse von komplexen Proteingemischen die zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE) die wichtigste und effektivste Methode. Dabei werden die Proteine nach zwei Kriterien in aufeinander folgenden Schritten aufgetrennt. Der erste Schritt bzw. die „erste Dimension“ ist eine isoelektrische Fokussierung (IEF), bei der die Proteine entsprechend ihres isoelektrischen Punkts (pI) in einem elektrischen Feld getrennt werden. Im zweiten Schritt oder in der „zweiten Dimension“ werden die Proteine nach ihren Molekulargewichten (M_r relatives Molekulargewicht) mithilfe einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt. So können in einem Arbeitsgang bis zu 10.000 verschiedene Proteine getrennt werden (Klose J, Kobalz U, 1995). Man erhält ein Muster von Proteinen, das spezifisch ist für eine Zell-Art, ein Gewebe oder eine Körperflüssigkeit unter definierten Bedingungen (Abb. 2.4).

Die 2D-PAGE wurde zuerst 1975 unabhängig voneinander sowohl von P.H. O'Farrell, als auch von J. Klose beschrieben (O'Farrell PH, 1975; Klose J, 1975). Durch die Einführung von immobilisierten pH-Gradienten (IPG)-Gelen für die erste Dimension durch A. Görg et al. 1988 wurde die 2D-PAGE vereinfacht und vor allen Dingen reproduzierbarer gemacht (Görg A, et al., 1988).

Bei der differentiellen Proteomanalyse ist das Ziel, quantitative Unterschiede einzelner Proteine unter verschiedenen Bedingungen zu erkennen. Dabei ist es essentiell, dass die Behandlungen

der Zellen, des Gewebes oder der Körperflüssigkeit sich nur in einem Parameter unterscheiden und die Probenaufarbeitung und 2D-PAGE unter standardisierten Bedingungen durchgeführt wird, damit eine reproduzierbare Auftrennung möglichst aller Proteine erreicht werden kann. Daher soll bei der Probenvorbereitung eine nach Möglichkeit quantitative

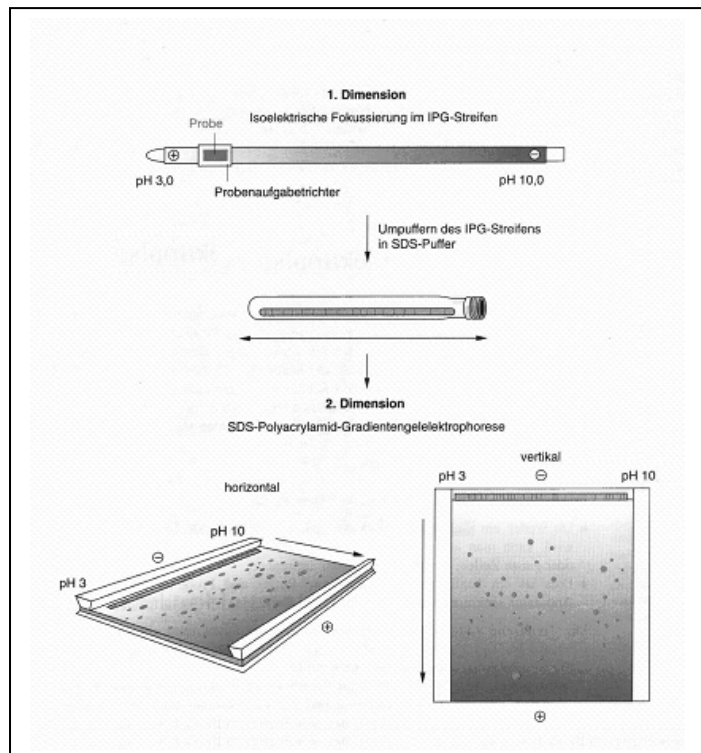


Abb. 2.4: Bei einer zweidimensionalen Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-PAGE) werden die Proteine in der 1. Dimension nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) und in der 2. Dimension nach ihrem Molekulargewicht (M_r) aufgetrennt. Man erhält ein für das jeweilige biologische Ausgangsmaterial charakteristisches Muster von Protein-Spots (aus Lottspeich H, Zorbas H (Hrsg.), Bioanalytik, 1998).

Solubilisierung der Proteine gewährleistet werden. Dabei ist darauf zu achten, dass so wenige Arbeitsschritte wie möglich nötig sind, da jede zusätzliche Manipulation der Zell- bzw. Proteinprobe die Gefahr des Proteinverlusts oder der unspezifischen Modifikation der Proteine birgt. Außerdem muss äußerst sauber gearbeitet werden, da jede Verunreinigung, zum Beispiel durch Keratin der Haut oder Haare, das Ergebnis verfälscht oder unbrauchbar macht.

Die aufgetrennten Proteine können mit verschiedenen Methoden sichtbar gemacht und anschließend analysiert werden. Um Unterschiede in den Proteinmustern mehrerer tausend Protein-Spots erkennen zu können, ist eine computergestützte Bildauswertung allerdings unumgänglich.

Interessante Protein-Spots werden anschließend aus dem Gel ausgeschnitten und in der Regel über massenspektrometrische Verfahren in Kombination mit Datenbank-Recherchen identifiziert.

2.7.2. *Probenvorbereitung*

Die Probenvorbereitung ist für die zweidimensionale Elektrophorese (2-DE) einer der wichtigsten Schritte. Dabei werden mehrere Ziele verfolgt:

1. Makromolekulare Wechselwirkungen über Disulfid-Brücken und nicht-kovalente Bindungen zwischen Proteinen, Proteinen und Lipiden oder Proteinen und Nukleinsäuren sollen gebrochen werden.
2. Es muss verhindert werden, dass die Proteine nach dem Lyse-Vorgang durch Enzyme, wie Proteasen, Phosphatasen, Glycosidasen oder andere verändert werden. Außerdem müssen die Bedingungen für die Zell-Lyse so gewählt werden, dass die Proteine nicht chemisch modifiziert werden.
3. Einige Bestandteile der Zellen, wie Salze, Lipide, Polysaccharide (einschließlich der Zellwände) und Nukleinsäuren interferieren mit der 2-DE, sodass diese nach Möglichkeit entfernt oder ihre Konzentrationen so gering wie möglich gehalten werden müssen.
4. Außerdem müssen die Proteine bis zum Abschluss der zweiten Dimension (SDS-PAGE) in Lösung gehalten werden. Dabei ist zu beachten, dass sie bei der isoelektrischen Fokussierung (IEF), dem ersten Auftrennungsschritt der 2-DE, zunächst nach ihrer Eigenladung aufgetrennt werden. Die Proteine sollten also nicht mit SDS in Lösung gebracht werden, oder dieses muss anschließend wieder entfernt werden.

Um die Disulfid-Brücken zu reduzieren und damit zu spalten, wird ein Überschuss an reduzierenden Thiol-Gruppen benötigt. O'Farrell setzte dafür im ersten 2-DE-Protokoll Mercaptoethanol ein (O'Farrell PH, 1975), was allerdings noch nicht zu optimalen

Ergebnissen führte. Ein besser geeignetes Reduktionsmittel ist Dithiothreitol (DTT), das in geringeren Konzentrationen eingesetzt werden kann.

Durch den Einsatz von chaotropen Verbindungen (Harnstoff, Thioharnstoff), die alle Parameter des Lösungsmittels, zum Beispiel die Dielektrizitätskonstante, verändern, werden die meisten nicht-kovalenten Wechselwirkungen, wie Wasserstoff-Brücken, elektrostatische und hydrophobe Wechselwirkungen, gebrochen (Herskovits TT, et al., 1970). Dabei werden die Proteine denaturiert. Allerdings steht Harnstoff in wässriger Umgebung im Gleichgewicht mit Ammoniumcyanat. Cyanat-Ionen können Proteine carbamylieren, wodurch das Protein-Muster der 2-DE-Gele verändert wird. Daher muss die Konzentration der Cyanat-Ionen, die abhängig von der Temperatur ist, so gering wie möglich gehalten werden (Hagel P, et al., 1971). So darf die Harnstoff-Lösung nicht über 37 °C erwärmt werden. Außerdem werden Ionentauscher eingesetzt, die die Cyanat-Ionen und auch andere störende Ionen entfernen sollen. Zusätzlich werden Träger-Ampholyte (primäre Amine), die mit den Cyanat-Ionen reagieren sollen, dem Lyse-Puffer zugefügt (Bjellqvist B, et al., 1993).

Die ungeladenen Chaotrope Harnstoff und Thioharnstoff können allerdings nur schwer Ionen-Bindungen mit hoher Ladungsdichte (z.B.: Nukleinsäuren) spalten (Sanders MM, et al., 1980). Daher macht es Sinn, zusätzlich den pH-Wert in den basischen Bereich anzuheben, sodass die allermeisten Proteine als Anionen vorliegen, und es so zu elektrostatischen Abstoßungen kommt (Horst MN, et al., 1980).

Thioharnstoff ist ein stärkeres Chaotrop als Harnstoff, sodass der gemeinsame Einsatz von Harnstoff und Thioharnstoff sowohl die Solubilisierung der Proteine, besonders auch der Membran- und Kernproteine (Gordon JA, Jencks WP, 1963; Molloy MP, et al., 1998), als auch den Protein-Transfer in das SDS-Polyacrylamidgel der zweiten Dimension verbessert (Rabilloud T, et al., 1997).

Um hydrophobe Wechselwirkungen, besonders mit Lipiden, zu minimieren, sollten zusätzlich im Lyse-Puffer Detergenzien vorhanden sein. Dabei ist darauf zu achten, dass nur zwitterionische, wie Cholidopropionsäuresulfonat (CHAPS), oder nichtionische Detergenzien, wie Polyoxyethylen-p-isooctylphenylether (Triton X100), die keine Nettoladung tragen und daher die IEF nicht stören, eingesetzt werden.

Das Problem, die Proteine intakt zu halten, ist besonders bei komplexen Proben, wie Gesamtzell- oder Gewebeextrakten, von Bedeutung. Bei der Zelllyse werden vor allem Hydrolasen (Phosphatasen, Glycosidasen und besonders Proteasen) aus Lysosomen freigesetzt. Die Phosphatasen und Glycosidasen werden durch die denaturierende Umgebung so schnell inaktiviert, dass sie die Proteine nicht mehr verändern können. Dagegen scheinen Proteasen auch längere Zeit in einer 9 M Harnstoff-Lösung noch aktiv zu sein (Colas des Francs C, et al., 1985). Dieses Phänomen soll vor allem für saure bis neutrale Lösungen gelten (Segers J, et al., 1986), während die Proteolyse bei alkalischem pH-Wert begrenzt ist (Hochstrasser DF, et al., 1988). Um die Aktivität der Proteasen zu hemmen werden Protease-Inhibitoren eingesetzt.

Salze, welcher Art und welchen Ursprungs auch immer, stören direkt die IEF, weil ihre Anreicherung an Anode und Kathode Zonen mit hoher Leitfähigkeit und geringer Feldstärke

bewirkt, in denen die Proteine nicht mehr ausreichend aufgetrennt werden können. Man kann zwar durch Dialyse oder Präzipitation der Proteine Salze entfernen, aber diese Schritte sind immer mit Proteinverlust verbunden. Daher sollte man bei Zellextrakten einen geeigneten salzfreien Wasch-Puffer für die Zellen benutzen und den Spannungsverlauf der IEF entsprechend einrichten.

Nukleinsäuren (DNA und RNA) stellen, wie schon erwähnt, für die Trennung der Proteine ebenfalls ein Problem dar, weil sie zum einen als Polyanionen über elektrostatische Wechselwirkungen Proteine binden können, und zum anderen als Makromoleküle die Viskosität der Lösung erhöhen und so kleine Poren des Polyacrylamidgels verstopfen. Eine Möglichkeit zur Entfernung der Nukleinsäuren ist ihr Verdau mit DNase und RNase (O'Farrell PH, 1975) oder mit Endonuclease. Eine andere mit der ersten kombinierbare Methode ist, die Proben bei hoher Drehzahl zu zentrifugieren (Rabilloud T, et al., 1986).

2.7.2.1. Materialien und Chemikalien

Geräte und Materialien

Potter Homogenisator 2 ml	B. Braun Biotech
Zentrifuge	Biofuge 28RS (Rotor #3740, r (max): 5,9 cm) Heraeus

Lösungen und Chemikalien

Lyse-Puffer	9,61 g	Urea	8 M	Sigma
	800 mg	CHAPS	4 %	Sigma
	24,2 mg	Tris-Base	10 mM	Sigma
	23,95 mg	Pefabloc	5 mM	Merck
	ad 20 ml	MilliQ-H ₂ O		
<i>à 1,5 ml aliquotiert</i>				Lagerung: – 80°C
Vor Gebrauch :	1,5 ml Lyse-Puffer + 15 mg	DTT	1 %	Sigma

Endonuclease (Benzonase ultrapure)	Serratia marcescens, recombinant	Sigma
---------------------------------------	----------------------------------	-------

2.7.2.2. Durchführung der Probenvorbereitung

Alle nun folgenden Schritte wurden auf Eis bei ca. 4°C durchgeführt.

- Zellen, die nach dem Ernten zunächst im Eisschrank bei –80°C zwischengelagert wurden, mussten erst auf Eis (ca. 4°C) aufgetaut werden.
- Das Volumen des Lyse-Puffers (mit 1 % DTT) wurde aufgrund von Erfahrung und Vorversuchen nach der Größe des Zellpellets so gewählt, dass eine

Proteinkonzentration von ca. 5 mg/ml zu erwarten war. Bei großen Kulturflaschen (175 cm²) und 80 %er Konfluenz der Zellen zum Zeitpunkt der Ernte wurde normalerweise ein Volumen zwischen 250 und 400 µl gewählt.

- Als erster Schritt wurden 0,9 IE Endonuclease pro Mikroliter Lyse-Puffer direkt oberhalb des Zellpellets an die Wand des Falcon-Tubes pipettiert und sofort danach das gesamte Volumen des Lyse-Puffers auf die Zellen gegeben.
- Mithilfe der Pipette wurden die Zellen im Lyse-Puffer suspendiert und komplett in den vorgekühlten Potter-Homogenisator überführt.
- Durch ca. zwanzig gleichmäßig rotierende Auf- und Abbewegungen des Potterstempels wurden die Zellen zerstört, homogenisiert und die Proteine freigesetzt.
- Die homogenisierte Suspension wurde möglichst vollständig in ein 1,5 ml-Eppendorf-Cup überführt und in der Biofuge 28 RS bei 4°C mit 28.000 rpm über 1 h zentrifugiert.
- Der Überstand wurde möglichst vollständig und vorsichtig in ein neues 1,5 ml-Eppendorf-Cup überführt und mit dem Vortex-Mischer gut gemischt.
- Aus der erhaltenen Proteinprobe wurde der Anteil zur quantitativen Proteinbestimmung entnommen und nach Bradford bestimmt.
- Die Proteinprobe wurde entweder bei -80°C gelagert oder direkt weiter für die isoelektrische Fokussierung (IEF) verwendet.

2.7.3. Isoelektrische Fokussierung (1. Dimension)

Bei der isoelektrischen Fokussierung (IEF) werden Proteine aufgrund ihres spezifischen isoelektrischen Punkts (pI) entlang eines pH-Gradienten in einem elektrischen Feld mit hoher Feldstärke aufgetrennt. Dabei wandern die Proteine anoden- oder kathodengerichtet soweit, bis sie den pH-Wert, ihren pI, erreicht haben, an dem ihre Nettoladung gleich Null ist (Abb. 2.5).

Für die Generierung eines pH-Gradienten im Gel gibt es zwei Möglichkeiten:

1. Gele, die ein Gemisch von sogenannten freien Trägerampholyten enthalten, bilden nach Anlegen einer Spannung einen pH-Gradienten aus (An der Lan B,

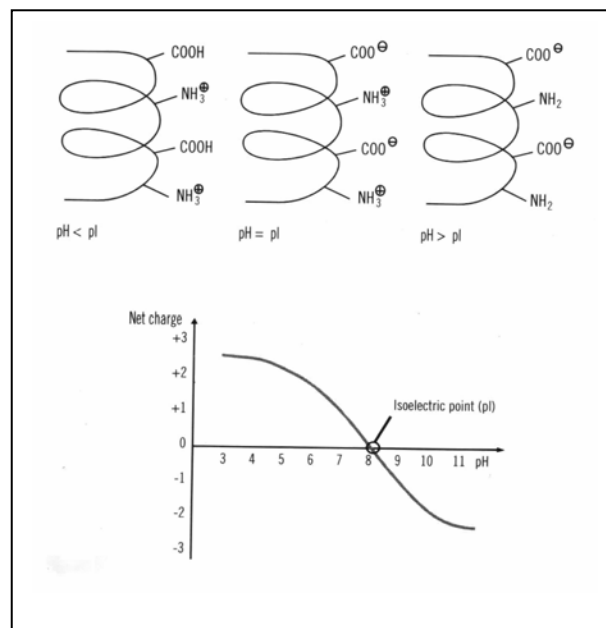


Abb. 2.5: Proteine wandern in einem elektrischen Feld entlang eines pH-Gradienten soweit, bis ihr isoelektrischer Punkt (pI) erreicht ist (aus: Berkelman T, Stenstedt T, 2-Electrophoresis – Principles and Methods).

Chrambach A, 1985). Trägerampholyte sind dabei Substanzen geringer molekularer Massen, die sowohl Amino-, als auch Carboxylgruppen in unterschiedlichen Verhältnissen tragen.

2. Immobilisierte pH-Gradienten-(IPG)-Gele, deren pH-Gradienten durch die Co-Polymerisation von klar definierten Chemikalien, sogenannten Immobilen, mit Acrylamid fest mit der Gelmatrix verbunden sind (Bjellqvist B, et al., 1982).

Es gibt verschiedene Arbeiten über die Vor- und Nachteile von Trägerampholyten-Gelen und IPG-Gelen (Corbett J, et al., 1994; Klose J, Kobalz U, 1995; Lopez MF, Patton WF, 1997). Ein erstes Grundprotokoll für die zweidimensionale Elektrophorese mit IPG-Gelen wurde 1988 von A. Görg entwickelt (Görg A, Postel W, Günther S, 1988).

Ein klarer Vorteil der IPG-Gele gegenüber den Trägerampholyten-Gelen ist, vor allem bei maschinell hergestellten IPG-Gelen, ihre hohe Reproduzierbarkeit, da der pH-Gradient fest und klar definiert ist und es nicht wie bei den Trägerampholyten nach längerer Fokussierzeit einen Drift zur Kathode gibt („cathodic drift“). Außerdem ist die Anwendung der IPG-Gele einfach und sicher, da die Gelmatrix direkt auf eine Trägerfolie polymerisiert ist und daher nicht so leicht beschädigt werden kann.

Bei den Trägerampholyten-Gelen ist der Übertritt der Proteine aus der wässrigen Proteinlösung in die Gelmatrix immer wieder ein Problem, weil es am Applikationspunkt an der Grenzfläche zum Gel zu einer so hohen Konzentration von Proteinen kommen kann, dass ihre Löslichkeit überschritten wird und es zu Ausfällungen kommt. Diesem Problem kann man mit IPG-Gelen begegnen, indem man das gesamte Gel in der zu untersuchenden Proteinlösung quellen oder „rehydratisieren“ lässt (Rabilloud T, et al., 1994; Sanchez JC, et al., 1997). Durch diese Methode kann man größere Volumina und größere Mengen an Protein auftragen. Bei der Rehydratisierung wird der Eintritt von Proteinen mit hohem Molekulargewicht in die Gelmatrix noch begünstigt, indem man eine geringe Spannung von zum Beispiel 50 V anlegt (Görg A, et al., 1999).

Ein weiterer Vorteil ist, dass man ein weites Angebot an verschiedensten pH-Gradienten hat, von sehr weiten Gradienten, wie zum Beispiel pH 3 - 12, bis zu sehr engen Gradienten mit sehr hoher Auflösung, wie zum Beispiel pH 5,5 – 7.

Ein kritischer Punkt bei der isoelektrischen Fokussierung ist die Löslichkeit der Proteine an ihrem isoelektrischen Punkt, da dort ihre Nettoladung Null ist, sodass sie sich nicht mehr gegenseitig elektrostatisch abstoßen. Es besteht die Gefahr der Aggregation und Präzipitation. Abgesehen von stark hydrophoben Proteinen werden präzipitierte Proteine bei der Equilibrierung mit SDS-Lösung zwar wieder gelöst, aber durch die Ausfällung von Proteinen in der Nähe ihres pI geht Trennschärfe verloren. Für die IEF ist es also sinnvoll, die Chaotropizität des Mediums zu erhöhen, um nach Möglichkeit die Proteine auch an ihrem pI in Lösung zu halten. Dafür wird die Proteinprobe mit einem speziellen „Rehydratisierungspuffer“, der als weiteres Chaotrop Thioharnstoff enthält, versetzt (Pasquali C, et al., 1997; Rabilloud T, et al., 1997; Rabilloud T, 1998).

Aufgrund der hohen Beladungskapazität (bis zu 10 mg Protein pro Gel) für mikropräparative Läufe (Hanash SM, et al., 1991; Bjellqvist B, et al., 1993; Posch A, et al., 1995) und der oben genannten Vorteile, entwickelte sich die 2-DE mit IPG-Gelen zur Technologie der Wahl in der Proteomanalyse (Wilkins MR, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF (Hrsg.), 1997). Eine große Vereinfachung für isoelektrische Fokussierung (IEF) war die Entwicklung eines integrierten Geräts, dem IPGphor (Islam R, et al., 1998), mit einer programmierbaren Spannungsquelle für Spannungen bis zu 8000 V und einem Peltier-Element zur Kontrolle der Temperatur (zwischen 18 und 25°C). In diesem Gerät können die IPG-Gele in speziellen Keramik-Küvetten sowohl rehydratisiert, als auch fokussiert werden.

Die IEF wird normalerweise mit einer relativ geringen Spannung begonnen, um Elektrolyte aus dem Gel zu entfernen. Danach kann im IPGphor-System die Spannung nach und nach auf bis zu 8000 V erhöht werden. Wie lange die isoelektrische Fokussierung dauern muss, oder anders ausgedrückt, wie groß das Produkt aus Spannung und Zeit sein soll, richtet sich nach pH-Gradient, Art der Probe und Menge an aufgetragenem Protein. Der Spannungsverlauf muss meistens durch Vorversuche ermittelt werden. Die Stromstärke sollte auf 50 µA/Gel begrenzt werden. Bei Proben mit höherer Elektrolytkonzentration kann es sein, dass die Zielspannungen nicht sofort erreicht werden. Deshalb sollte zur besseren Reproduzierbarkeit der IEF als Maß für die Zeitfenster der einzelnen Spannungsschritte nicht die absolute Zeit, sondern das Produkt aus erreichter Spannung und Zeit eingesetzt werden. Die optimale Temperatur für die IEF liegt bei 20°C (Görg A, et al., 1991). Wird die IEF bis zu 200.000 Vh ausgedehnt, kann man einerseits die Gele mit einer größeren Proteinmenge beladen, andererseits werden die Spots besser fokussiert, das heißt, dass sich das Verhältnis zwischen Signal und Grundrauschen verbessert, was besonders wichtig für gering exprimierte Proteine ist (Humphery-Smith I, Blachstock W, 1997).

2.7.3.1. Materialien und Chemikalien

Geräte und Materialien

Isoelectric Focussing Unit	IPGphor	Amersham Biosciences
Keramik-Küvette	Strip Holder, 24 cm	Amersham Biosciences
IPG-Gele	pH 4 – 7, 24 cm	Amersham Biosciences
Elektroden-Filterpapier	IEF Electrode Strips (15 x 3 mm geschnitten)	Amersham Biosciences
Filterpapier	S&S Filter Paper Circles Ø125mm	Schleicher & Schuell

Lösungen und Chemikalien

Proteinprobe in Lyse-Puffer	Konzentration	Ermittelt nach Bradford
Bromphenolblau-Lösung (1 %)	100 mg ad 10 ml	Bromphenolblau MilliQ-H ₂ O
		Sigma

Rehydratisierungspuffer	9,61 g	Urea	8 M	Sigma
	2,44 g	Thiourea		Sigma
	800 mg	CHAPS	4 %	Sigma
	24,2 mg	Tris-Base	10 mM	Sigma
	23,95 mg	Pefabloc	5 mM	Merck
	444,4 µl	Pharmalyte	0,8 %	Amersham
		3 – 10 (36 %)		Biosciences
	20 µl	Bromphenolblau-	10 µg/ml	
		Lösung (1 %)		
	ad 20 ml	MilliQ-H ₂ O		
<i>á 1,5 ml aliquotiert</i>				Lagerung : – 80 °C
Vor Gebrauch:	1,5 ml Rehydratisierungs-			
	puffer + 15 mg	DTT	1 %	Sigma
Paraffinöl	PlusOne Immobiline DryStrip Cover Fluid			Amersham Biosciences

2.7.3.2. Durchführung der Rehydratisierung

- Zunächst wurden die Proteinprobe und der Rehydratisierungspuffer aus dem Eisschrank (-80°C) genommen und zum Auftauen auf Eis (ca. 4°C) gestellt.
- Währenddessen wurde entsprechend der Proteinkonzentration der Proteinprobe und der aufzutragenden Proteinmenge das Volumen der Proteinprobe und des Rehydratisierungspuffers berechnet. Dabei war für die Rehydratisierung der 24 cm langen IPG-Gele ein Gesamtvolumen von 450 µl einzusetzen.

$$\text{Volumen (Proteinprobe)} = \text{Proteinmenge } [\mu\text{g}] / \text{Proteinkonzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

$$\text{Volumen (Rehydratisierungspuffer)} = 450 \mu\text{l} - \text{Volumen (Proteinprobe)} [\mu\text{l}]$$

- Das bei –30°C gelagerte IPG-Gel ließ man bei Raumtemperatur auftauen.
- Danach wurde das errechnete Volumen des Rehydratisierungspuffers gleichmäßig über die gesamte Länge in die Keramik-Küvette pipettiert.
- Anschließend wurde das errechnete Volumen der Proteinprobe ebenfalls über die gesamte Länge der Keramik-Küvette zu dem vorgelegten Rehydratisierungspuffer pipettiert.
- Beim Pipettieren beider Lösungen war darauf zu achten, dass nicht an oder sogar über den Rand pipettiert wurde, wodurch Proteinmaterial verloren ginge und Harnstoffkristalle entstehen könnten, die den Verlauf der IEF stören würden.

- Das IPG-Gel wurde vom sauren Ende her (spitze Seite) von der Schutzfolie befreit (laut Amersham Biosciences würde beim Entfernen von der basischen Seite her die Gelmatrix zum Teil zerstört) und vorsichtig mit der Gelseite nach unten auf die Mischung aus Probenpuffer und Rehydratisierungspuffer in die Keramik-Küvette gelegt. Dabei wurde das saure Ende (spitz) über der Anode und das basische Ende (gerade) über der Kathode positioniert.
- Es musste immer darauf geachtet werden, dass zwischen Gel und Keramik-Küvette keine Luft eingeschlossen wurde, da es sonst zu einer ungleichmäßigen Rehydratisierung gekommen wäre.
- Um ein Austrocknen des Gels und damit das Auskristallisieren des hochkonzentrierten Harnstoffs zu vermeiden, wurde das Gel sofort tropfenweise mit 3 ml Paraffinöl überschichtet. Da das Paraffinöl hydrophob ist und eine geringere Dichte hat als die Mischung aus Proteinprobe und Rehydratisierungspuffer, ordnete sich diese unter dem Paraffinöl an und konnte nahezu quantitativ von dem IPG-Gel aufgenommen werden.
- Die Keramik-Küvette wurde mit ihrem Deckel verschlossen und zur Rehydratisierung entsprechend der Anordnung der Elektroden in das IPGphor-Gerät eingesetzt. Für die Rehydratisierung wurde eine Zeit von 15 h bei einer geringen Spannung nach folgendem Spannungsverlauf angesetzt:

1.	30 min	Gradient	0 – 50 V
2.	14 h 30 min		50 V

2.7.3.3. Durchführung der isoelektrischen Fokussierung (IEF)

- Wenn bekannt war, dass die Proben einen relativ hohen Elektrolytgehalt hatten, wurden zur Entfernung der Elektrolyte nach Abschluss der Rehydratisierung zwei Vorläufe mit folgendem Spannungsverlauf vor die eigentliche isoelektrische Fokussierung geschaltet:

1.	10 min	Gradient	0 – 1000 V
2.	50 min		1000 V

- Dafür wurde nach der Rehydratisierung das Paraffinöl abgegossen, leicht feuchtes Elektroden-Filterpapier (auf Filterpapier mit Pinzette ausgedrückt) zwischen das Gel und die Elektroden gelegt und das Gel wieder mit 3 ml Paraffinöl überschichtet. Zwischen den IEF-Vorläufen und vor der IEF wurden die Elektroden-Filterpapiere jeweils gewechselt.
- Bei geringem Elektrolytgehalt konnte direkt nach der Rehydratisierung mit der IEF begonnen werden. Dafür wurden ebenfalls leicht feuchte Elektroden-Filterpapiere

zwischen Gel und Elektroden gelegt und das IPG-Gel mit 3 ml Paraffinöl überschichtet.

- Die IEF wurde für 24 cm lange IPG-Gele mit pH-Gradienten von pH 4 – 7 mit folgendem Spannungsverlauf (durch Vorversuche ermittelt und optimiert) durchgeführt:

1.	75 Vh		150 V
2.	300 Vh		750 V
3.	1995 Vh	Gradient	750 - 3500 V
4.	3500 Vh		3500 V
5.	4250 Vh	Gradient	3500 - 5000 V
6.	5000 Vh		5000 V
7.	6500 Vh	Gradient	5000 - 8000 V
8.	88.000 Vh		8000 V
9.	∞		200 V

- Der letzte Schritt des Spannungsverlaufs hatte keinen Einfluss mehr auf die eigentliche Fokussierung, sondern diente lediglich dazu, die fokussierten Proteine vor Diffusion zu schützen.
- Nach Abschluss der IEF betrug das Produkt aus Spannung und Zeit ca. 110.000 Vh. Das Gel wurde dann entweder direkt weiter für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) equilibriert, oder erst in einem Equilibrierungsröhrchen bei -80°C gelagert.

2.7.4. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2. Dimension)

In der zweiten Dimension werden die Proteine, die in der ersten Dimension nach ihren isoelektrischen Punkten aufgetrennt wurden, wie auch für die eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (1D-SDS-PAGE) beschrieben nach ihren Molekulargewichten aufgetrennt. Dabei ist das am häufigsten eingesetzte Puffersystem das Tris-Glycin-System nach Laemmli (Laemmli, UK, 1970). Ein neues Puffersystem, das auf Piperidinopropionamid (PPA) basiert und getrennte Kathoden- und Anodenpuffer hat, ist für die Ettan DALT-Fertiggele entwickelt worden.

In jedem Fall müssen die Gele der IEF in zwei speziellen Puffern equilibriert werden, um die Bedingungen für die Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE optimal anzupassen. Diese Equilibrierungspuffer enthalten vor allem SDS, damit sich die SDS-Protein-Komplexe ausbilden können. Außerdem sollen durch die Equilibrierungsschritte zwitterionische Detergenzien (wie CHAPS) entfernt werden. Der erste Equilibrierungspuffer enthält zur vollständigen Reduktion der Disulfidbrücken einen Überschuss an Dithiothreitol (DTT). Im zweiten Equilibrierungspuffer wird Iodacetamid eingesetzt, um einerseits DTT, das im ersten

Schritt nicht verbraucht wurde und bei Silber-gefärbten Gelen für Streifenbildung verantwortlich ist, zu entfernen (Görg A, et al., 1987) und andererseits die Cystein-Reste durch Alkylierung vor Rückoxidation zu schützen.

Nach der Equilibrierung wird das Gel der IEF auf das Polyacrylamidgel der zweiten Dimension aufgebracht. Dabei gibt es die Möglichkeit der horizontalen oder der vertikalen Auftrennung (Görg A, et al., 1988; Görg A, et al., 1995). Die Vorteile der vertikalen SDS-PAGE hängen vor allem mit den Maßen der Gele zusammen. Zum einen sind die Gele im Regelfall dicker, sodass mehr Protein aufgetrennt werden kann, zum anderen kann man mit größeren Gelen (24 cm Breite) arbeiten, sodass man eine bessere Auflösung erhält.

2.7.4.1. Materialien und Chemikalien

Geräte und Materialien

Elektrophorese-Kammer	Ettan DALT System, Separation Unit	Amersham Biosciences
Netz- und Kontroll-Gerät	Ettan DALT System, Power Supply and Control Unit	Amersham Biosciences
Gel-Kassette	Ettan DALT Precast Gel Cassette	Amersham Biosciences
Gel-Platzhalter	Ettan DALT Blank Cassette Insert	Amersham Biosciences
Kippschüttler	Duomax 1030	Heidolph
Thermoblock	Dri-Block® DB-2D	Techne
Equilibrierungsröhrchen	Equilibration Tube Set	Amersham Biosciences
Tapeten-Roller		Obi
Lineal		Hoefer
Elektroden-Filterpapier	IEF Electrode Strips	Amersham Biosciences

Lösungen und Chemikalien

Equilibrierungspuffer I	90,125 g	Urea	6 M	Sigma
	75 g	Glycerol p.a., wasserfrei	30 %	Roth
	5 g	SDS	2 %	Sigma
	1,5 g	Tris-Base	50 mM	Sigma
	1,25 g	DTT	0,5 %	Sigma
	ad 250 ml	MilliQ-H ₂ O		
Equilibrierungspuffer II	90,125 g	Urea	6 M	Sigma
	75 g	Glycerol p.a., wasserfrei	30 %	Roth
	5 g	SDS	2 %	Sigma
	1,5 g	Tris-Base	50 mM	Sigma
	11,25 g	Iodacetamid	4,5 %	Sigma
	ad 250 ml	MilliQ-H ₂ O		

Puffer-System	Ettan DALT Buffer System	Amersham Biosciences
Agarose/Bromphenolblau	Agarose Cover Fluid	Amersham Biosciences

2.7.4.2. Vorbereitung der Elektrophorese-Kammer

- Die Ettan DALT II – Elektrophorese-Kammer wurde zunächst zweimal mit je 5 l MilliQ-H₂O unter Einsatz der Pumpe gespült.
- Anschließend wurde die untere Kammer (Anode) mit dem Anoden-Puffer des Ettan DALT II – Puffer-Systems befüllt. Dafür wurden zunächst ca. 2 l MilliQ-H₂O vorgelegt, das Anoden-Puffer-Konzentrat (100-fach) komplett (75 ml) zu dem MilliQ-H₂O in die Kammer gegeben und mit MilliQ-H₂O auf 7 l bis zur angegebenen Marke aufgefüllt. Mithilfe der Pumpe wurde der Puffer gut durchmischt.
- Danach wurden die benötigten Gel-Platzhalter (12 abzüglich Anzahl der Gele) von hinten nach vorne spannungsfrei in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt.
- Der Puffer wurde auf 25°C temperiert.
- 2,5 l Kathoden-Puffer wurden vorbereitet, indem 250 ml Kathoden-Puffer-Konzentrat (10-fach) des Ettan DALT II – Puffer-Systems in einem geeigneten Gefäß mit MilliQ-H₂O verdünnt wurden.

2.7.4.3. Equilibrierung der IPG-Gele

- Die Equilibrierungspuffer I und II wurden jeweils frisch in dem benötigten Umfang (je 10 ml pro Gel) hergestellt.
- Die fokussierten IPG-Gele wurden aus dem Eisschrank oder direkt aus dem IPGphor-Gerät genommen, in den Equilibrierungsröhrchen mit je 10 ml Equilibrierungspuffer I versetzt und auf dem Kippschüttler ca. 30 min geschwenkt.
- Anschließend wurden die IPG-Gele mit je 10 ml Equilibrierungspuffer II noch mal ca. 30 min auf dem Kippschüttler equilibriert.

2.7.4.4. Vorbereitung der Gele für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

- Während die IPG-Gele equilibriert wurden, konnten die Ettan DALT II – Fertiggele in die dafür vorgesehenen Gel-Kassetten eingesetzt werden. Dabei wurden je 2 ml des Gelpuffers des Ettan DALT II – Puffer-Systems auf die Glasplatten der Gel-Kassetten

pipettiert und darauf die Fertiggele mit der Gelseite zur Glasplatte gelegt. Luftblasen und überschüssiger Gelpuffer wurden mithilfe eines Tapeten-Rollers entfernt.

- Um zu vermeiden, dass die obere Kante des Polyacrylamidgels partiell antrocknete, wurden 200 µl Gelpuffer darauf pipettiert und sofort wieder entfernt. Die equilibrierten IPG-Gele wurden kurz in MilliQ-H₂O getaucht, um überschüssigen Equilibrierungspuffer zu entfernen, und anschließend kurz in den vorbereiteten Kathoden-Puffer. Direkt danach wurden sie mit der sauren Seite (spitz) nach links auf die oberen Kanten der Polyacrylamidgele gelegt und mit dem „Hoefer-Lineal“ korrekt platziert.
- An der rechten oder linken Seite der Gele konnten mit 10 µl Proteinmarker bestückte Elektroden-Filterpapiere (ca. 4 x 4 mm) auf die Polyacrylamidgele gelegt werden.
- Zur Entfernung von Lufteinschlüssen zwischen IPG-Gel und Polyacrylamidgel und damit zum besseren Übergang der Proteine in das Polyacrylamidgel, wurde jedes IPG-Gel und Proteinmarker-Filterpapier mit ca. 85°C heißer Sealing-Solution (Agarose mit Bromphenolblau) des Ettan DALT II – Puffer-Systems überschichtet. Dabei war darauf zu achten, dass die Zwischenräume an den Seiten der Gele komplett mit Sealing-Solution verschlossen wurden.

2.7.4.5. Durchführung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2. Dimension)

- Nach Erkalten der Agarose wurden die Gele vorsichtig und spannungsfrei in die freien Plätze der Elektrophorese-Kammer eingesetzt. Die Gel-Platzhalter und die Gel-Kassetten mussten dicht mit der Elektrophorese-Kammer abschließen, damit die obere Kammer (Kathode) dicht gegenüber der unteren Kammer (Anode) war.
- Der vorbereitete Kathoden-Puffer wurde nun in die obere Kammer gefüllt und die Elektrophorese-Kammer verschlossen.
- Die anschließende SDS-PAGE wurde über die Leistung kontrolliert. Bei 25°C wurde die SDS-PAGE nach folgendem Leistungsverlauf, der am Netz- und Kontroll-Gerät einzustellen war, durchgeführt:

1. Phase	30 min	3 W/Gel
2. Phase	Nach Lauf der Bromphenolblau-Front	20 W/Gel

- Die SDS-PAGE wurde beendet, wenn die Bromphenolblau-Front die untere Kante des Gels erreicht hatte.
- Die Gele wurden aus den Gel-Kassetten genommen und entweder in Fixierlösung zwischengelagert (maximal 72 h), direkt weiter mit Silber oder Coomassie

Brillantblau G-250 gefärbt, oder ohne Fixierung der interessante Teil ausgeschnitten und für einen Western-Blot weiter bearbeitet.

- Die Elektrophorese-Kammer wurde nach der SDS-PAGE wieder zweimal mit MilliQ-H₂O bei laufender Pumpe gespült.

2.7.5. *Färbung der Polyacrylamidgele*

Die Auftrennung der Proteine allein nützt nichts, solange sie nicht sichtbar gemacht werden. Für die Anfärbung der Proteine in einem Polyacrylamidgel gibt es verschiedene klassische Möglichkeiten:

- Färbung mit organischen Farbstoffen
- Färbung durch Reduktion von Silber-Ionen
- Färbung mit Fluoreszenz-Farbstoffen
- Detektion von radioaktiven Isotopen

Die letzten beiden Punkte sollen nur erwähnt bleiben, weil sie für die vorliegende Arbeit keine Relevanz besitzen.

Am häufigsten werden wohl auch heute noch bei der Färbung mit organischen Farbstoffen die Textilfarbstoffe Coomassie Brilliantblau R-250 und G-250 eingesetzt, die schon 1965 bei der Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen Verwendung fanden (Meyer TS, Lamberts BL, 1965). Die Färbeprotokolle mit Coomassie Brilliantblau sind einfach und schnell durchzuführen.

Die Färbung von Proteinen durch Reduktion von Silber-Ionen ist je nach Methode 10- bis 100-fach sensitiver. Diese Silberfärbemethoden wurden ab 1979 zur Detektion von Proteinen in Gelen eingeführt (Switzer RC, et al., 1979; Merril CR, et al., 1979). Die Methoden der Silberfärbung sind allerdings bedeutend komplizierter als die der Färbung mit organischen Farbstoffen (Rabilloud T, 1990; Rabilloud T, 1992).

Die angefärbten Gele können Aufschluss geben über Trennqualität, über die Anzahl der Proteinbanden oder –spots in den gesetzten Grenzen, bei Benutzung von Markerproteinen über die Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine oder unter gewissen Voraussetzungen durch densitometrische Verfahren über relative Quantitäten der einzelnen Proteine.

2.7.5.1. *Färbung mit Coomassie Brilliantblau-Farbstoffen*

Die Färbung mit den Triphenylmethan-Farbstoffen Coomassie Brilliantblau R-250 und G-250 beruht auf ihren elektrostatischen Wechselwirkungen mit freien geladenen Amino- und Iminogruppen der Proteine im sauren Medium. Coomassie Brilliantblau R-250 liegt in gelöster Form vor und färbt nicht nur die Proteine, sondern auch das Polyacrylamidgel stark an, sodass

es nach der Inkubation in der Färbelösung durch intensives Waschen wieder entfärbt werden muss.

Galanter ist hier die Färbung mit Coomassie Brilliantblau G-250, das durch die beiden Methylierungen am Triphenylmethan-Gerüst bei saurem pH-Wert eine geringere Löslichkeit aufweist und daher als kolloidale Dispersion vorliegt. Die Proteine werden durch den gelösten Anteil angefärbt, während die Hauptmasse des Farbstoffes in kolloidaler Form vorliegt, sodass das Polyacrylamidgel kaum angefärbt wird. Nach kurzem Auswaschen hat man eine beinahe hintergrundfreie Proteinfärbung. Diese Methode ist etwas komplizierter in der Handhabung, dafür aber deutlich empfindlicher (Neuhoff V, et al., 1985; Neuhoff V, et al., 1988).

2.7.5.2. Materialien und Chemikalien

Geräte und Materialien

Färbe-Automat	Automated Gel Stainer	Amersham Biosciences
Färbewannen	25 x 30 cm TS.282	Kartell
Kippschüttler	Duomax 1030	Heidolph

Lösungen und Chemikalien

Fixierlösung	100 ml	Essigsäure 98 % p. a.	Sigma
	500 ml	Methanol	Merck
	ad 1000 ml	MilliQ-H ₂ O	
Färbelösung	240 ml	Stainer A	Novex
	240 ml	Methanol	Merck
	ad 1000 ml	MilliQ-H ₂ O	
<i>Erst später:</i>	60 ml	Stainer B	Novex
		(Coomassie Brilliantblau G-250)	
Stabilisierungslösung	100 g	(NH ₄) ₂ SO ₄	Sigma
	ad 500 ml	MilliQ-H ₂ O	

2.7.5.3. Durchführung der Färbung mit kolloidalem Coomassie Brilliantblau G-250

- Das zu färbende Gel wurde in einer Färbewanne unter 300 – 400 ml Fixierlösung 10 min auf dem Kippschüttler geschwenkt.
- Weitere Gele, die die 2D-PAGE durchlaufen hatten, wurden je nach Anzahl entweder parallel gefärbt oder in Fixierlösung zwischengelagert.

- Die Fixierlösung wurde wieder abgeschüttet, 19 Teile der Färbelösung ohne Stainer B hinzugefügt und 10 min auf dem Kippschüttler bewegt.
- Nach dieser Zeit wurde zu den 19 Teilen Färbelösung 1 Teil Stainer B (Coomassie Brilliantblau G-250) gegeben und mindestens 3 h und maximal 12 h weiter geschwenkt.
- Anschließend wurde die Färbelösung dekantiert. Das gefärbte Gel wurde zweimal mit mindestens je 250 ml MilliQ-H₂O gewaschen und danach noch mal mit mindestens 250 ml MilliQ-H₂O für ca. 7 h auf dem Kippschüttler bewegt.
- Zur Stabilisierung des Protein-Farbstoff-Komplexes wurde das Gel in Folie mit Stabilisierungslösung eingeschweißt und bei 2 – 8°C gelagert.

2.7.5.4. Färbung durch Reduktion von Silber-Ionen

Das Prinzip der Silber-Färbung ist die Affinität der Proteine zu Kationen, in diesem Fall zu Silber-Kationen. Aber auch andere Anionen, wie SDS und Chlorid zeigen Affinitäten zu Silber-Ionen, sodass diese vorher weitgehend entfernt werden sollten. Das heißt aber auch, dass der Silber-Färbung ein Fixierungsschritt vorangehen muss. Die gebundenen Silber-Kationen werden durch ein Reduktionsmittel, wie Formaldehyd, zu metallischem Silber reduziert. Um die Sensitivität zu erhöhen, werden zwischen Fixierungsschritt und Färbeschritt noch sensitivierende Substanzen eingesetzt (Rabilloud T, Vuillard L, Gilly C, Lawrence JJ, 1994).

Aus den mehr als achtzig verschiedenen Silberfärbemethoden kann man zwei Familien definieren:

1. Färbung durch Silbernitratlösung mit Formaldehyd als Entwickler in alkalischer Natriumcarbonatlösung, zum Beispiel nach H. Blum (Blum H, et al., 1987).
2. Färbung durch Silber-Amin-Komplex mit Formaldehyd in leicht saurer Lösung als Entwickler, zum Beispiel nach M. Eschenbruch und R.R. Bürk (Eschenbruch M, Bürk RR, 1982).

Bei der vorliegenden Arbeit sollten die aufgetrennten Proteine nach der Silberfärbung noch mit massenspektrometrischen Methoden analysierbar sein. Daher wurde ein Färbeprotokoll eingesetzt, das ohne vernetzendes Glutaraldehyd auskommt und daher kompatibel mit „matrix assisted laser desorption ionisation mass spectrometry“ (MALDI-MS) ist (Yan JX, et al., 2000).

2.7.5.5. Materialien und Chemikalien

Geräte und Materialien

Färbe-Automat	Automated Gel Stainer	Amersham Biosciences
Färbewannen	25 x 30 cm TS.282	Kartell
Kippschüttler	Duomax 1030	Heidolph
Folienschweißgerät	Polystar 243 M	
Polyethylenfolie		

Lösungen und Chemikalien

Fixierlösung	100 ml	Essigsäure 98 % p. a.	Sigma
	400 ml	Ethanol absolut	Riedel-de Haën
	ad 1000 ml	MilliQ-H ₂ O	
Sensitivierungslösung	300 ml	Ethanol absolut	Riedel-de Haën
	2 g	Na ₂ S ₂ O ₃	Sigma
	68 g	NaAcetat	Sigma
	ad 1000 ml	MilliQ-H ₂ O	
Färbelösung	10 ml	AgNO ₃ -Lösung (10 %)	Sigma
	ad 400 ml	MilliQ-H ₂ O	
Entwicklerlösung	25 g	Na ₂ CO ₃	Sigma
	2 ml	Formaldehyd (37 %)	Sigma
	ad 1000 ml	MilliQ-H ₂ O	
Stopp-Lösung	5 g	Glycin	Fluka
	ad 1000 ml	MilliQ-H ₂ O	

2.7.5.6. Durchführung der Silberfärbung

- Nach Abschluss der 2D-SDS-PAGE wurde das zu färbende Gel in die Färbewanne des Färbeautomaten gelegt, der direkt vorher einmal das gesamte Reinigungsprogramm mit MilliQ-H₂O durchlaufen hatte.
- Weitere Gele, deren 2D-SDS-PAGE ebenfalls abgeschlossen war, wurden in den Färbewannen unter je 250 ml Fixierlösung bis zur Färbung gelagert. Zur Bewegung der Gele und der Fixierlösung wurden diese Färbewannen auf dem Kippschüttler oder direkt auf dem Färbeautomaten geschwenkt.

- Zur Färbung des eingelegten Gels arbeitete der Färbeautomat folgende Schritte ab:

1.	Fixieren	Fixierlösung	340 ml	14 h
2.	Fixieren	Fixierlösung	340 ml	15 min
3.	Fixieren	Fixierlösung	340 ml	15 min
4.	Sensitivieren	Sensitivierungslösung	340 ml	30 min
5.	Waschen	MillQ-H ₂ O	340 ml	8 min
6.	Waschen	MillQ-H ₂ O	340 ml	8 min
7.	Waschen	MillQ-H ₂ O	340 ml	8 min
8.	Waschen	MillQ-H ₂ O	340 ml	8 min
9.	Waschen	MillQ-H ₂ O	340 ml	8 min
10.	Färben	Färbelösung	340 ml	30 min
11.	Waschen	MillQ-H ₂ O	340 ml	8 min
12.	Waschen	MillQ-H ₂ O	340 ml	8 min
13.	Entwickeln	Entwicklerlösung	340 ml	3 min
14.	Stoppen	Stopp-Lösung	340 ml	40 min
15.	Waschen	MillQ-H ₂ O	340 ml	8 min
16.	Waschen	MillQ-H ₂ O	340 ml	8 min
17.	Waschen	MillQ-H ₂ O	340 ml	8 min

- Alle weiteren Gele, die in Fixierlösung zwischengelagert wurden, durchliefen das gleiche Programm unter Auslassung des ersten Fixierschrittes.
- Fertig gefärbte Gele wurden densitometrisch erfasst, in Folie eingeschweißt und bei 2 – 8°C gelagert.

2.7.6. Computergestützte Bildanalyse

Um erkennen zu können, welche Proteine sich unter definierten Bedingungen in ihrer Quantität verändern, ist es notwendig, die nach der 2D-PAGE visualisierten Proteinmuster genau zu analysieren. Eine visuelle Auswertung ist bei 2D-Gelen mit mehreren Tausend aufgetrennten Proteinen nicht praktikabel und viel zu ungenau. Daher ist man auf eine weitgehend automatisierte Bildauswertung mit Systemen, bestehend aus Scanner-Densitometer und entsprechender Software, angewiesen.

Die Arbeitsschritte einer computergestützten Gelauswertung sind vom Prinzip her bei allen Systemen mehr oder weniger identisch:

1. Digitalisierung der Gel-Bilder
2. Aufbereitung der Gel-Bilder
3. Automatische Spoterkennung mit anschließender Bearbeitung
4. Quantifizierung und Normierung der Protein-Spots
5. Gelvergleich
6. Datenanalyse

Die digitalisierten 2D-Gele werden hinsichtlich der Proteindetektion nach bestimmten Algorithmen bezüglich der Intensität, berechnet aus der optischen Dichte und Fläche des jeweiligen Protein-Spots, und der Koordinaten ausgewertet.

Durch den Vergleich von Gelen einer bestimmten Gel-Serie können Intensitätsunterschiede von Protein-Spots erkannt werden, die dann einer weiteren Identifizierung durch massenspektrometrische Verfahren mit anschließender Datenbank-Recherche unterzogen werden.

Geräte und Materialien

Computer	Macintosh G4	Apple Macintosh
Scanner-Densitometer	GS-700 Imaging Densitometer	Bio-Rad
Software zur Bildanalyse	PDQuest Version 6.1	Bio-Rad

2.7.6.1. Durchführung der computergestützten Bildanalyse

- Zunächst wurde jedes gefärbte Gel mit den der Färbemethode entsprechenden Filtern mit einer Auflösung von 240 dpi eingescannt und abgespeichert.
- Daraufhin wurden aus allen Gel-Bildern einer Serie die mit Protein-Spots beladenen Bereiche so ausgeschnitten, dass ihre Proteinmuster zur größtmöglichen Deckung kamen.
- Für alle geschnittenen Gel-Bilder einer Serie wurden nun im sogenannten „Spot Detection Parameter Wizard“ (Abb. 2.6 (A)) die Parameter zur automatischen Detektion der Protein-Spots bestimmt. Dabei wurden folgende Parameter eingestellt:
 1. Ein Protein-Spot mit der geringsten noch zu detektierenden Intensität wurde als untere Grenze der Sensitivität gesetzt.
 2. Ein Spot mit der geringsten noch zu detektierenden Ausdehnung wurde als Abgrenzung zu Verunreinigungen mit kleinerer Fläche gewählt.
 3. Es wurde ein Spot als größter zu detektierender Spot gewählt, um die Parameter zur Subtraktion des Hintergrunds und zur Entfernung von Streifen zu bestimmen.

4. Zur Hintergrundberechnung wurde ein Bereich bestimmt, der möglichst gleichmäßig gefärbt und ohne Streifen und sonstige Verunreinigungen war.
 5. Zur besseren Detektion von überlappenden Spots wurde ein Gauß-Modell angewendet.
- Alle Gele, die miteinander verglichen werden sollten, wurden nach den gleichen gesetzten Parametern detektiert und in einem sogenannten „Matchset“ zusammengefasst.
 - Für jedes Matchset wurde aus den zu vergleichenden Gelen ein Gel ausgesucht, das als Standardgel fungierte, mit dem alle Gele aus dem Matchset verglichen werden sollten.
 - Es wurden sogenannte „Landmarken“ in jedem Gel gesetzt. Dabei handelte es sich um gut aufgelöste und in jedem Gel auftauchende Protein-Spots, die vom Programm benötigt wurden, um die Positionen der anderen Spots richtig zuzuordnen und mögliche Unterschiede und Verzerrungen zu kompensieren (Abb. 2.6 (B)).
 - Daraufhin musste die automatische Zuordnung noch geprüft und in vielen Fällen editiert werden.
 - Um die Gele quantitativ miteinander vergleichen zu können, mussten Intensitätsunterschiede, die zum Beispiel auf Unterschiede in der Färbung der Gele zurückzuführen waren, ausgeglichen werden. Dafür wurden die Gesamtintensitäten der Gele auf einen Wert normiert und die Intensitäten der einzelnen Spots in PPM (parts per million) berechnet (Abb. 2.6 (C)).
 - Um Unterschiede zwischen den Gelen oder Gruppen von Gelen zu finden, wurden sogenannte „Analysis Sets“ gebildet. Dabei detektierte das Programm die Spots, die Unterschiede in der vorgegebenen Größenordnung zeigten (Abb. 2.6 (D)).

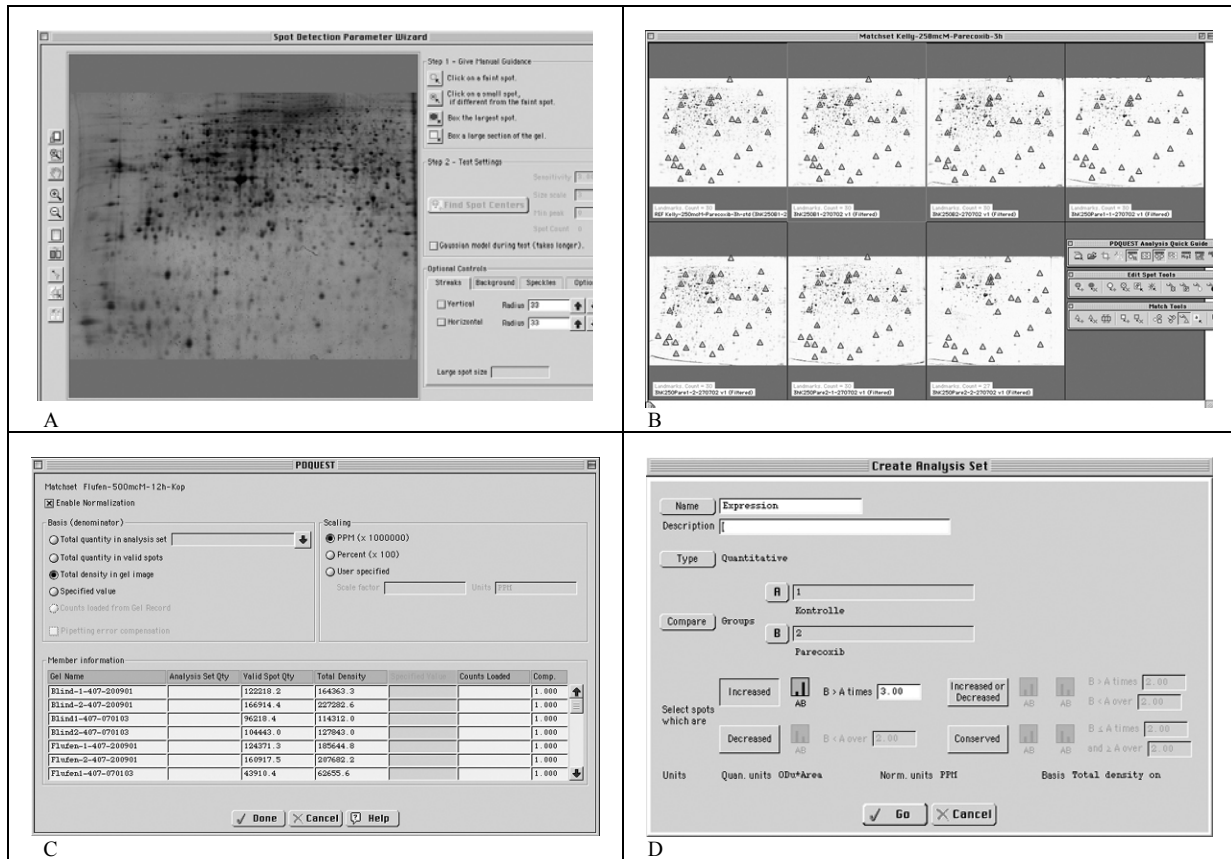


Abb. 2.6: (A) „Spot Detection Wizard“ zur Einstellung der Parameter für die automatische Spot-Detektion. (B) Das Setzen von Landmarken ist für das Programm essentiell für die Zuordnung der Protein-Spots und zum Ausgleich von Verzerrungen. (C) Alle Gele eines Matchsets werden für die quantitative Auswertung normiert. (D) In sogenannten Analysis Sets können quantitative Unterschiede der Protein-Spots detektiert werden.

2.8. Protein-Identifikation durch Massenspektrometrie und Datenbankrecherchen

2.8.1. Überblick

Die in der Proteomforschung untersuchten Proteinproben enthalten Tausende Proteine unterschiedlichster Konzentrationen. Solche Gemische müssen vor der massenspektrometrischen Analyse zunächst mit einer hohen Auflösung aufgetrennt werden (z. B. 2-D-PAGE). Die zu bestimmenden Proteine werden dann mithilfe von Proteasen (z. B. Trypsin) in Peptidfragmente von einigen wenigen bis maximal 100 Aminosäuren gespalten und massenspektrometrisch bestimmt. Die erhaltenen Listen von Peptidmassen, auch „peptid-mass fingerprinting“ (PMF) genannt, werden mit theoretischen Listen von Peptidmassen aus Protein-Datenbanken verglichen. Viele Proteine können so bei signifikanter Übereinstimmung identifiziert werden. (Abb. 2.7)

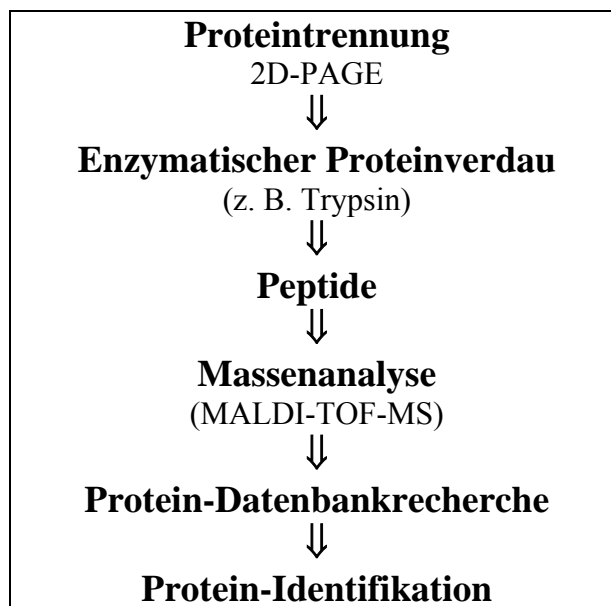


Abb. 2.7: Schematischer Ablauf einer Protein-Identifikation

2.8.2. Prinzipien der Massenspektrometrie

Bei der Analyse und Identifikation von Proteinen und Peptiden ist die Massenspektrometrie mittlerweile unverzichtbar geworden. Alle Massenspektrometer (MS) haben drei essentielle Komponenten, mit denen die Massen von individuellen Molekülen bestimmt werden können:

1. Eine Ionenquelle, in der die zu analysierenden Moleküle ionisiert und beschleunigt werden.

2. Ein Massenanalysator, in dem die ionisierten und beschleunigten Moleküle im Vakuum ohne Feldspannung nach ihrem Massen/Ladungs-Verhältnis (m/z) getrennt werden.
3. Ein Detektorsystem, das die Intensitäten der Ionenströme misst.

Die gemessenen Daten werden als Spektren aus Ionenintensität *versus* m/z -Verhältnis computergestützt ausgewertet und dargestellt.

Der Trend zur Analyse und Identifikation von Proteinen und Peptiden mit massenspektrometrischen Methoden begann in den späten 80er Jahren mit der Entwicklung von zwei schonenden Verfahren zur Molekülionisierung. M. Karas und F. Hillenkamp veröffentlichten 1988 ihre Arbeiten zur „Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionisation-MS“ (MALDI-MS), während J.B. Fenn et al. ein Jahr später die Methode der „Elektrospray-Ionisation-MS“ (ESI-MS) publizierten (Karas M, Hillenkamp F, 1988; Fenn JB, et al., 1989). Diese Ionisierungsmethoden sind eigentlich mit unterschiedlichen Massenanalysatoren kombinierbar. In der Praxis hat sich jedoch durchgesetzt, dass MALDI-MS mit einem Time-of-flight(TOF)-Massenanalysator kombiniert ist, während ESI in der Regel mit einem Quadrupol-Analysator und Tandem-Massenspektrometer (MS/MS) kombiniert wird.

Weil in dieser Arbeit die Proteine mit MALDI-TOF-MS analysiert wurden, soll nur auf diese Methode näher eingegangen werden.

MALDI-TOF-MS ist wahrscheinlich die einfachste und gegenüber Verunreinigungen wohl auch die unempfindlichste Methode, so dass sie ideal für die Analyse von Biomolekülen ist. Die Genauigkeit der Messungen liegt bei Molekülen bis ~ 25 kDa bei $\sim \pm 0,01 - 0,05$ % und bei Molekülen bis ~ 300 kDa bei $\sim \pm 0,05 - 0,3$ %.

Für die Ionisierung wird die zu analysierende Probe zunächst mit einer als Matrix fungierenden kleinen aromatischen Säure, wie zum Beispiel 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB), gemischt, auf eine metallische Probenträgerplatte aufgetragen und getrocknet. Beim Trocknungsvorgang kommt es zu einer Co-Kristallisation von Probe- und Matrixmolekülen. Die Probenträgerplatte wird in das MALDI-TOF-MS eingesetzt und unter Vakuum ($10^{-5} - 10^{-8}$ Torr) bei angelegter Hochspannung (~ 20 kV) mit einem gepulsten Laser beschossen. Dabei sollte die Matrix so gewählt sein, dass sie den Laserstrahl stark absorbiert und damit in kürzester Zeit sehr viel Energie aufnehmen kann, was zum Verdampfen der Matrix und der eingeschlossenen zu analysierenden Moleküle führt. Gleichzeitig kommt es bei der Energieübertragung auf die Analyten durch Protonierung oder Deprotonierung und durch Oxidation oder Reduktion zu deren Ionisierung. Bei diesem Verfahren werden in der Regel einfach geladene Ionen erzeugt, die durch den gepulsten Laser als diskrete „Ionenpakete“ auftreten. Diese werden unter Hochspannung beschleunigt und durchfliegen dann den feldfreien Flugzeit-Massenanalysator (TOF). Alle Ionen haben die gleiche finale kinetische Energie, wenn sie in die feldfreie Driftstrecke eintreten, sodass ihre Ankunftszeit (time-of-flight) in einem linearen Detektor von den unterschiedlichen Massen abhängt. Dabei fliegen leichte Ionen schneller, als schwere. Ihr m/z -Verhältnis berechnet sich wie folgt:

$$m/z = 2U * t^2 / L^2$$

m = Ionenmasse, z = Anzahl der Elementarladungen, die das Ion trägt, U = Beschleunigungsspannung, t = gemessene Flugzeit, L = Länge der Driftstrecke

Das MALDI-TOF-MS muss mit Substanzen von definiertem Gewicht kalibriert werden. Ein höheres Auflösungsvermögen, als mit linearen MALDI-TOF-MS, erreicht man, indem man Geräte mit einem sogenannten Ionenreflektor einsetzt. Dabei wird am Ende der Flugbahn ein homogenes elektrisches Feld mit gleicher Polarität wie die beschleunigten Ionen erzeugt, das eine leicht höhere Spannung hat, als das elektrische Feld der Ionenquelle. Die ionisierten Probenmoleküle treten in dieses Reflektorfeld, auch Ionenspiegel genannt, ein, werden abgebremst und wieder in Richtung Reflektor-Detektor beschleunigt. Dabei kommt es zu einer Geschwindigkeitsfokussierung. Betrachtet man zum Beispiel zwei Ionen mit dem gleichen m/z-Verhältnis, aber leicht unterschiedlichen kinetischen Energien, so taucht das Ion mit der höheren kinetischen Energie tiefer in das Reflektorfeld ein, als das Ion mit der geringeren kinetischen Energie, und wird daher auch später wieder in Richtung Detektor beschleunigt, sodass die Flugzeit beider Ionen am Detektor mehr oder weniger ausgeglichen ist (Abb. 2.8).

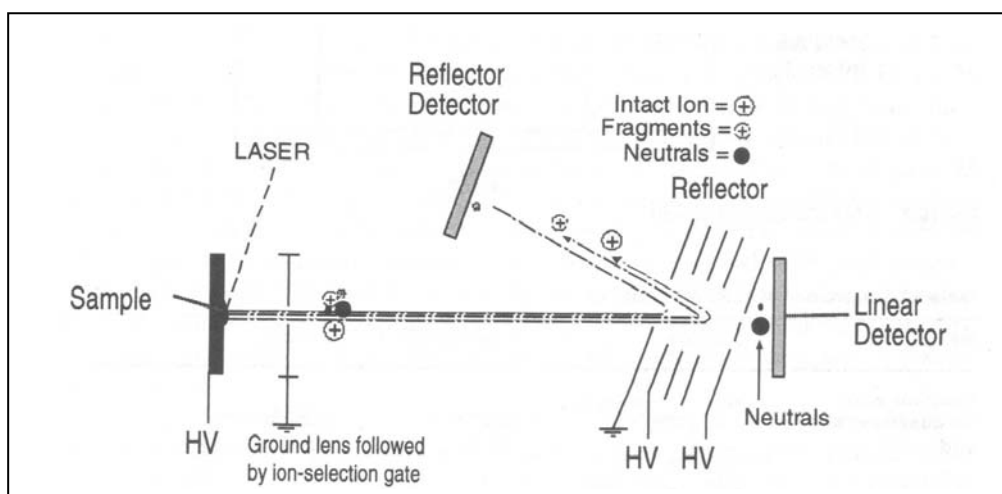


Abb. 2.8: Schematische Darstellung eines MALDI-TOF-Massenspektrometers mit Ionenreflektor (aus Railloud T (Ed.), 2000).

2.8.3. Vergleich von MS-Daten mit Daten aus Protein-Datenbanken

Es sind verschiedene Algorithmen beschrieben worden, um ein Kollektiv von gemessenen Peptidmassen eines verdauten Proteins mit Daten aus Proteindatenbanken oder DNA-Datenbanken vergleichen zu können. Diese Technik wird allgemein als „peptid-mass fingerprinting“ (PMF) bezeichnet (Henzel WJ, et al., 1993; James P, et al., 1993; Mann M, et al., 1993; Pappin DJ, et al., 1993; Yates JR 3rd, et al., 1993). Dabei werden die gemessenen Peptidmassen, die durch den Verdau mit einem bestimmten Reagenz (z. B. das Enzym Trypsin) erhalten wurden, mit den theoretisch berechneten Massen der Peptide eines jeden

Datenbank-Eintrags, die man bei dem Verdau mit dem spezifischen Reagenz erhalten würde, verglichen. Es wird ein sogenannter „score“ berechnet, der ein Maß für die Wahrscheinlichkeit ist, dass das analysierte Protein identisch ist mit dem in der Datenbank gefundenen.

Die Suche nach identischen Peptidmassen kann direkt in Proteindatenbanken erfolgen oder in DNA-Datenbanken, aus denen die Peptid- und Proteinmassen theoretisch berechnet werden können. Seit Abschluss des „Humanen Genom Projektes“ (Lander ES, et al., 2001; Venter JC, et al., 2001) ist es jetzt von nahezu jedem Protein oder Peptid möglich die theoretische Masse zu berechnen und die Lage der codierenden Sequenz auf den Chromosomen zu bestimmen. Das erhöht die Trefferquote bei Datenbank-Recherchen erheblich. Dennoch ist häufig den identifizierten Proteinen nicht eindeutig eine Funktion oder Beteiligung an irgendwelchen Regelkreisen zuzuordnen. Ihre Funktionen müssen dann in vielen Folgeversuchen weiter untersucht werden.

2.8.4. *Durchführung des Proteinverdaus, der massenspektrometrischen Analyse und der Datenbank-Recherche*

Da in der Arbeitsgruppe, in der die vorliegenden Untersuchungen gemacht wurden, die technischen Voraussetzungen für die Protein-Identifikation mit massenspektrometrischen Methoden fehlten, wurde dieser Teil der Arbeit an Firmen vergeben, die kommerziell Protein-Identifikationen mithilfe von MALDI-TOF-MS betreiben.

In zehn Fällen wurde die Firma PROT@GEN AG in Düsseldorf beauftragt und in zwei Fällen die Firma SEQLAB.

2.9. RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction)

2.9.1. Überblick

Die Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR), mit der die Genexpression von Zellen, Geweben und Organismen untersucht werden kann, ist eine spezielle Anwendung der Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR). Dabei wird zunächst RNA mithilfe einer Reversen Transkriptase (RT) in komplementäre DNA (copy-DNA, cDNA) umgeschrieben, die dann als Vorlage für eine anschließende PCR dient (Powell LM, et al., 1987).

Die Entwicklung der PCR durch K. Mullis im Jahr 1985 revolutionierte die Erforschung der DNA (Saiki RK, et al., 1985). In einem interessanten Artikel der Zeitschrift *Scientific American* beschreibt Mullis, wie es zu der Entwicklung der PCR-Methode kam (Mullis KB, 1990), für die er 1993 den Chemie-Nobelpreis erhielt. Ursprünglich wurde für die Amplifizierung der DNA das sogenannte Klenow-Fragment der E.coli-Polymerase-I eingesetzt (Saiki RK, et al., 1985; Mullis KB, et al., 1986; Mullis KB, Faloona F, 1987). Nachteilig war allerdings, dass dieses Enzym bei jedem Denaturierungsschritt durch die Hitze inaktiviert wurde und vor jedem Amplifizierungsschritt wieder neu hinzugefügt werden musste. Dadurch war diese Technik noch sehr umständlich und schwer zu automatisieren. Erst durch den Einsatz einer hitzestabilen Polymerase, der Taq-DNA-Polymerase aus dem hitzebeständigen Bakterium *Thermus aquaticus* (Saiki RK, et al., 1988), konnte die PCR-Technik vereinfacht und vor allem automatisiert werden, da nun die Enzymlösung über den gesamten Verlauf einer Amplifizierung nicht erneuert werden muss.

Im Prinzip ist eine PCR relativ einfach und besteht typischerweise aus drei Schritten, die zyklisch wiederholt werden:

1. Denaturierung der DNA
2. Anlagerung der Primer (Annealing)
3. Elongation

Für den Denaturierungsschritt wird die Probe auf ca. 95°C erhitzt, um doppelsträngige DNA aufzuschmelzen und damit für die Anlagerung der Primer vorzubereiten. Primer sind kurze einzelsträngige DNA-Moleküle (18 – 30 Basen), die komplementär zu den Enden der betreffenden Sequenz der DNA-Matrize (template) sind. Bei entsprechender Annealingtemperatur kommt es zur Hybridisierung der Primer an die Template-DNA, wobei die optimale Temperatur des Annealingschritts von der Basenzusammensetzung der Primer abhängig ist und individuell ermittelt werden muss. Anschließend wird die Temperatur auf das Temperaturoptimum der Polymerase, 72°C bei der eingesetzten Taq-Polymerase, angehoben und die Primer werden komplementär zur DNA-Matrize verlängert, sodass wieder doppelsträngige DNA entsteht. Mit einem anschließenden Denaturierungsschritt beginnt ein neuer Zyklus. Unter optimalen Bedingungen verdoppelt sich pro Zyklus der durch die Primer

definierte DNA-Abschnitt, sodass über den Verlauf der PCR die Ziel-Sequenz exponentiell vermehrt wird. Die Praxis hat jedoch gezeigt, dass die Effizienz der PCR aufgrund verschiedener Faktoren nicht 100 % ist. Diese Faktoren werden besonders in späteren PCR-Zyklen verstärkt. So wird die Ziel-DNA millionenfach vermehrt, sodass sie ab einem gewissen Punkt im Überschuss vorliegt und die Enzymmenge der begrenzende Faktor für die Reaktion ist. Außerdem nimmt auch die Aktivität des Enzyms im Verlauf der Reaktion ab, da trotz der Hitzestabilität die hohe Temperatur das Enzym nach und nach denaturiert. Hinzu kommt, dass es durch die Zunahme der Ziel-DNA zu gegenseitiger Hybridisierung kommt, wodurch die Anlagerung der Primer gestört und die Effektivität der Vervielfältigung weiter vermindert wird. So ist die Anzahl der Zyklen nicht beliebig, da die Reaktion nur begrenzt exponentiell verläuft. In der Regel wird ein PCR-Zyklus 20- bis 40-mal wiederholt.

2.9.2. *Isolierung von Gesamt-RNA aus Monolayer-Zellen*

Um reproduzierbare Ergebnisse erzielen zu können, war es unbedingt erforderlich, sauber und vor allem RNase-frei zu arbeiten. Daher wurden stets Handschuhe getragen, die häufig gewechselt wurden. Eppendorf-Cups und Pipettenspitzen wurden aus gesonderten autoklavierten Gefäßen entnommen und die Arbeitsflächen mit RNaseZap®-Spray behandelt, um Verunreinigungen durch RNase so weit wie möglich zu vermeiden bzw. zu entfernen.

Die Gesamt-RNA aus den untersuchten Zellen wurde mithilfe des PeqGOLD RNAPure™-Systems von Peqlab isoliert. Die Hauptbestandteile dieser Fertiglösung zur RNA-Isolierung sind Guanidinisothiocyanat (GTC) und Phenol. GTC ist ein chaotropes Salz, das sehr effektiv Proteine denaturiert und damit inaktiviert, auch RNasen (Chirgwin JJ et al., 1979). Durch das Phenol werden Proteine und auch kleinere DNA-Fragmente abgetrennt. Das PeqGOLD RNAPure™-System beruht auf der 1987 von P. Chomczynski und N. Sacchi beschriebenen „single-step-Methode“ (Chomczynski P, Sacchi N, 1987). Nach Zugabe von Chloroform kommt es zu einer Phasentrennung, wobei die gesamte RNA, also ribosomale RNA (rRNA), Transfer-RNA (tRNA) und messenger-RNA (mRNA), sich in der wässrigen Phase anreichert. Die mRNA macht daran nur einen Anteil von ca. 2 % aus, was aber im allgemeinen für das Umschreiben in cDNA ausreichend ist.

2.9.2.1. Materialien und Chemikalien

Geräte und Materialien

Schüttler	Titramax 100	Heidolph
Tischzentrifuge	Biofuge fresco (Rotor #3765, r (max): 7,3 cm)	Heraeus

Lösungen und Chemikalien

Spray zur Entfernung von RNase-Kontaminationen		RNaseZap®	Ambion
Lösung zur RNA-Isolierung		PeqGOLD RNAPure™	Peqlab
Chloroform			Merck
Isopropanol			Riedel-de Haën
Ethanol 70 %		70 g Ethanol absolut p.a. (frisch) 30 g RNase-freies Wasser	Riedel-de Haën
TE-Puffer	10 mM Tris	10 ml	Tris-Stammlösung (1 M, pH 8)
	1 mM EDTA	2 ml	EDTA-Stammlösung (0,5 M, pH 8)
		ad 1000 ml	DEPC-H ₂ O
DEPC-H ₂ O		1 g	DEPC
		ad 1000 ml	MilliQ-H ₂ O <i>Über Nacht stehen gelassen, dann autoklaviert.</i>

2.9.2.2. Durchführung der RNA-Isolierung

- Ca. 2×10^5 Zellen der Neuroblastom-Zelllinie KELLY wurden in einer Petrischale (\varnothing 5 cm) mit je 5 ml Medium angesetzt.
- Bei einer Konfluenz von ca. 80 % (nach ca. 72 h) wurden die Zellen mit einem potentiell zytotoxischen Wirkstoff in einer bestimmten Konzentrationen über einen gewissen Zeitraum behandelt.
- Nach Ende der Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und die Zellen direkt in der Petrischale durch Zugabe von 1 ml pepGOLD RNAPure™ lysiert. Die Petrischale wurde kurz auf den Schüttler gestellt, danach wurde die Lösung mehrmals mit der Pipette aufgezogen und schließlich möglichst quantitativ in ein 1,5ml-Eppendorf-Cup überführt, das dann 5 min lang auf Eis gestellt wurde.
- Anschließend wurden pro eingesetzten Milliliter pepGOLD RNAPure™ 150 µl Chloroform in das Eppendorf-Cup pipettiert und 15 sec auf dem Vortexer kräftig geschüttelt. Die erhaltene Emulsion wurde 15 min auf Eis stehen gelassen und anschließend mit der Tischzentrifuge bei 13.000 rpm und 4°C über eine Dauer von 20 min zentrifugiert. Es bildeten sich drei Phasen aus: eine untere gelbliche Phenol-Chloroform-Phase, eine obere farblose wässrige Phase und eine dazwischenliegende

Interphase mit unlöslichen Bestandteilen. DNA und Proteine befanden sich in der Phenol-Chloroform-Phase und der Interphase, während sich die gesamte RNA ausschließlich in der oberen wässrigen Phase angereichert hatte.

- Die wässrige Phase (ca. 400 – 600 µl) wurde möglichst quantitativ in ein neues Eppendorf-Cup überführt, mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt und auf dem Vortexer kräftig geschüttelt.
- Zur Präzipitation der RNA wurde die Probe für 30 min auf –80°C gekühlt und anschließend auf Eis wieder aufgetaut.
- Danach wurde die Probe wieder bei 13.000 rpm und 4°C 30 min lang zentrifugiert. Die RNA sollte dann als gelartiges Pellet am Boden des Eppendorf-Cups liegen, war aber de facto kaum zu erkennen.
- Der wässrige Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Anschließend wurde das RNA-Pellet gewaschen, indem man 500 µl Ethanol 70 % hinzufügte, kurz vortexte und 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugierte. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt.
- Nach Entfernung des Ethanols wurde das RNA-Pellet über eine Stunde an der Luft getrocknet.
- Anschließend wurde die RNA in 50 µl TE-Puffer (pH 8, RNase-frei) gelöst und zur Verbesserung der Lösbarkeit 10 min bei 70°C in den Heizblock gestellt.
- Nach Ablauf dieser Zeit wurde die RNA-Lösung wieder sofort auf Eis gestellt, oder direkt bei –80°C zwischengelagert.

2.9.3. *Quantifizierung der isolierten RNA*

Die Konzentration von Nukleinsäuren, die ein Absorptionsmaximum bei 260 nm zeigen, lässt sich photometrisch bestimmen. Es ist bekannt, dass bei einer optischen Dichte von 1,0, gemessen in einer Küvette mit der Länge 10 mm, die Konzentration von Doppelstrang-DNA (dsDNA) ungefähr 50 µg/ml, von Einzelstrang-DNA (ssDNA) 33 µg/ml und von RNA ca. 40 µg/ml ist. Daraus ergibt sich für die Konzentrationsbestimmung der RNA folgende Formel:

$[\text{RNA}] = A_{260} \times 40 \text{ µg/ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$
--

Das Photometer GeneQuant II, das zur Quantifizierung der isolierten RNA eingesetzt wurde, misst parallel noch die optischen Dichten bei drei weiteren Wellenlängen: bei 320 nm zur Kompensation des Hintergrunds, bei 230 nm und 280 nm zur Überprüfung der Reinheit. Dabei wurden nur solche RNA-Proben zur reversen Transkription eingesetzt, bei denen folgende Kriterien erfüllt waren:

- $A_{230} < A_{260} > A_{280}$
- $A_{260} / A_{280} \geq 1,7$

2.9.3.1. Materialien und Chemikalien

Geräte und Materialien

Photometer	GeneQuant II	Amersham Biosciences
------------	--------------	-------------------------

Lösungen und Chemikalien

DEPC-H ₂ O	1 g ad 1000 ml	DEPC MilliQ-H ₂ O <i>Über Nacht stehen gelassen, dann autoklaviert.</i>	Sigma
-----------------------	-------------------	--	-------

2.9.3.2. Durchführung der RNA-Quantifizierung

- Von der aus der RNA-Isolierung erhaltenen RNA-Probe wurde 1 µl entnommen und mit DEPC-H₂O 1 : 100 verdünnt (+ 99 µl DEPC-H₂O).
- Am Photometer wurden die für eine RNA-Bestimmung notwendigen Parameter gewählt und eingestellt.
- Die Messküvette des Photometers wurde zweimal mit DEPC-H₂O gespült und anschließend zur Bestimmung des Leerwerts 100 µl DEPC-H₂O vermessen.
- Danach wurden jeweils 100 µl der zu bestimmenden Proben-Verdünnungen gemessen. Die vom Photometer berechnete Konzentration der RNA-Probe und das A_{260}/A_{280} -Verhältnis wurden notiert.

2.9.4. DNase-Verdau

Obwohl durch die RNA-Isolierung mit dem pepGOLD RNAPure™-System die RNA von der DNA getrennt wurde, können noch Spuren von DNA in der RNA-Probe enthalten sein, die die RT-PCR stören und falsche bzw. nicht reproduzierbare Ergebnisse bewirken könnten. Vor der eigentlichen reversen Transkription wird also noch möglicherweise eingeschleppte DNA durch DNase verdaut.

2.9.4.1. Materialien und Chemikalien

Geräte und Materialien

Heizblock	Digi-Block JR	Laboratory Devices
Tischzentrifuge	Biofuge fresco (Rotor #3765, r (max): 7,3 cm)	Heraeus

Lösungen und Chemikalien

5x Erststrangpuffer		Invitrogen
DNase 1-Lösung		Invitrogen
EDTA-Lösung	25 mM	Invitrogen
RNase-freies Wasser		Ambion

2.9.4.2. Durchführung des DNase-Verdaus

- Aufgrund der Ergebnisse der RNA-Quantifizierung wurde das Volumen der RNA-Probe für 1,5 µg RNA errechnet, dieses in ein Eppendorf-Cup pipettiert und mit RNase-freiem Wasser auf 7,5 µl aufgefüllt.
- Je nach Anzahl (n) der Proben wurde folgender DNase-Mastermix angesetzt:
2 µl 5x Erststrangpuffer (n+1)
+ 0,5 µl DNase1 (n+1)
- Die Lösung wurde mit dem Vortexer gut gemischt und kurz abzentrifugiert. Anschließend wurde zu jeder RNA-Probe 2,5 µl der DNase-Lösung pipettiert und 15 min bei 37°C im Heizblock inkubiert.
- Zum Stoppen des Verdaus wurde zu jeder Probe 1 µl EDTA-Lösung (25 mM) gegeben, kurz gevortext, abzentrifugiert und 10 min bei 65°C im Heizblock inkubiert.
- Anschließend wurden die Proben kurz auf Eis gestellt und abzentrifugiert.

2.9.5. *Synthese von cDNA aus mRNA mithilfe der Reversen Transkriptase (Reverse Transkription)*

Für das Umschreiben von mRNA in cDNA werden sogenannte Oligo-dT-Primer verwendet, die aus 12-18 Thymidinen bestehen und an den für mRNAs charakteristischen Poly-A⁺-Schwanz binden. Die Elongation dieser Oligo-dT-Primer wird durch eine reverse Transkriptase in 5'→3'-Richtung katalysiert. Für die vorliegende Arbeit wurde eine

modifizierte reverse Transkriptase aus dem *Moloney murine leukemia virus* (MMLV-RT) eingesetzt, die deutlich höhere Temperaturen verträgt und keine intrinsische RNase H-Aktivität besitzt und daher deutlich längere Transkripte ermöglicht, als die üblicherweise verwendeten reversen Transkriptasen. Die MMLV-RT ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, während die reverse Transkriptase, die aus dem *Avian myoblastosis virus* (AMV-RT) gewonnen wird und eine mögliche Alternative zur MMLV-RT ist, eine DNA-Polymerase ist, die sowohl RNA-, als auch DNA-abhängig DNA synthetisiert, außerdem DNA-Exonuclease- und RNase H-Aktivität besitzt.

2.9.5.1. Materialien und Chemikalien

Geräte und Materialien

Heizblöcke	Digi-Block JR	Laboratory Devices
Tischzentrifuge	Biofuge fresco (Rotor #3765, r (max): 7,3 cm)	Heraeus

Lösungen und Chemikalien

5x Erststrangpuffer				Invitrogen
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer		0,5 µg/µl		Invitrogen
DTT-Lösung				Invitrogen
dNTP-Lösung	10 mM	100 µl	DNA Polymerization Mix (20 mM)	Amersham Biosciences
		100 µl	RNase-freies Wasser	Ambion
DEPC-H ₂ O		1 g ad 1000 ml	DEPC MilliQ-H ₂ O <i>Über Nacht stehen gelassen, dann autoklaviert.</i>	Sigma
Reverse Transkriptase	SuperScript™II	Rnase H ⁻		Gibco BRL Life Technologies
Ribonuclease-Inhibitor	RNasin®			Promega

2.9.5.2. Durchführung der Reversen Transkription

- Zu den aus dem DNase-Verdau erhaltenen 11 µl einer jeden RNA-Probe wurde jeweils 1 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈ Primer pipettiert, durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette gemischt und für 10 min bei 70°C inkubiert, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen.
- Anschließend wurden die Proben für 1 min auf Eis gestellt, kurz bei 4°C zentrifugiert und bis zur Fortsetzung der reversen Transkription wieder auf Eis gestellt.
- Je nach Anzahl (n) der Proben wurde folgender RT-Mastermix auf Eis angesetzt:
 - 2 µl 5xErststrangpuffer (n+1)
 - + 1 µl dNTP-Lösung (10 mM) (n+1)
 - + 2 µl DTT-Lösung (100 mM) (n+1)
 - + 1 µl DEPC-H₂O
 - + 1 µl SuperScript™II RNase H⁻ (200 U/µl) (n+1)
 - + 1 µl RNasin (40 U/µl) (n+1)
- Die Lösung wurde auf dem Vortexer kurz und gut gemischt und bei 4°C abzentrifugiert.
- Zu jeder RNA-Probe wurden 8 µl des RT-Mastermixes pipettiert. Zur Hybridisierung der Oligo-dT-Primer wurden anschließend die Proben 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und danach zur Synthese 50 min auf 42°C (Temperaturoptimum der reversen Transkriptase) erwärmt.
- Die Reaktion wurde durch Denaturierung der MMLV-RT bei 95°C über 5 min gestoppt. Danach wurden die Proben sofort wieder auf Eis gestellt, kurz abzentrifugiert und bei -20°C gelagert oder direkt zur Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt.

2.9.6. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die von K.B. Mullis entwickelte Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde oben bereits weitgehend erläutert (Saiki RK, et al., 1985), so dass an dieser Stelle noch auf die Wahl der Primer, die Optimierung ihrer Annealingtemperatur und auf die Ermittlung der optimalen cDNA-Konzentration eingegangen werden muss.

Für diese Arbeit wurden im allgemeinen Primer einer Länge von 20 Basen eingesetzt. Die für die zu untersuchende mRNA optimalen Primer wurden hauptsächlich mithilfe des im Internet verfügbaren Programms „Primer3“ (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) ermittelt (Rozen S, Skaletzky H, 2000). Verschiedene Punkte sind bei der Wahl der Primer wichtig, die von diesem Programm berücksichtigt wurden:

- Der Anteil von Guanin und Cytosin sollte bei 40 – 60 % liegen.

- Die Schmelztemperatur sollte 55 – 80°C betragen, um ausreichend hohe Annealingtemperaturen zu erreichen.
- Die Sequenz der Primer sollte für das gewünschte Amplifikationsprodukt spezifisch sein, um Artefakte zu vermeiden. Daher ist der Vergleich mit Datenbanken ungemein wichtig.
- Primer sollten keine internen Sekundärstrukturen wie Haarnadeln bilden können.
- Um Primerdimere zu vermeiden, sollte ein Primerpaar eine möglichst geringe Komplementarität aufweisen.

Die durch das Programm ermittelten Primersequenzen wurden von dem Unternehmen Eurogentech synthetisiert, in einer Konzentration von 100 µM geliefert und in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt.

Die optimale Annealingtemperatur eines jeden Primerpaares wurde experimentell mithilfe einer sogenannten Gradienten-PCR ermittelt. Dabei wurden 12 cDNA-Proben wie unten beschrieben mit dem entsprechenden Primer amplifiziert, mit dem Unterschied, dass es nicht nur eine Annealingtemperatur gab, sondern für jede Probe eine bestimmte Temperatur im allgemeinen zwischen 50 und 70°C. Nach elektrophoretischer Auftrennung über ein Agarose-Gel wurde nach Färbung und anschließender Auswertung des Ergebnisses die optimale Annealingtemperatur bestimmt.

Für eine semiquantitative RT-PCR ist es wichtig, dass soviel cDNA eingesetzt wird, dass nach Abschluss der Amplifikation unterschiedliche Konzentrationen der cDNA detektiert werden können. Diese Konzentrationen wurden für jede Ziel-DNA durch Verdünnungsreihen experimentell ermittelt, indem die Konzentration gewählt wurde, bei der sich im angefärbten Agarose-Gel die Intensität der Bande eindeutig von den Banden der nächst höher und nächst niedriger konzentrierten Probe unterschied.

2.9.6.1. Materialien und Chemikalien

Geräte und Materialien

Gradienten-PCR-Gerät	T-Gradient	Biometra
PCR-Gerät	GeneAmp PCR System 2400	Perkin Elmar
Tischzentrifuge	Biofuge fresco (Rotor #3765, r (max): 7,3 cm)	Heraeus
PCR-Cups	PCR Softtubes 0,2 ml	Biozym

Lösungen und Chemikalien

Taq DNA Polymerase	5 U/µl	Sigma
10xPCR-Puffer		Sigma

dNTP-Lösung	2 mM	20 µl	DNA Polymerization Mix (20 mM)	Amersham Biosciences
		180 µl	RNase-freies Wasser	Ambion
Vorwärts-Primer	10 µM			Eurogentech
Rückwärts-Primer	10 µM			Eurogentech
RNase-freies Wasser				Ambion

Primer und PCR-Bedingungen

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Annealingtemperatur (°C)	cDNA- Verdünnung
Cox-1-F Cox-1-R	CAG CCC TTC AAT GAG TAC CG CCC ATC ATC CTG ACT GGC AT	56,4	1 : 10
Cox-2-F Cox-2-R	AAT GAG TAC CGC AAA CGC TT GAT GAG AGA CTG AAT TGA GG	54,0	1 : 300
eEF2-F eEF2-R	GCC CAT CTA CCT TGT GGA GA GCC AGT GGT CAA ACA CAC AC	65,9	1 : 400
Eno-1-F * Eno-1-R *	CCA ACC CAA AGA GGA TCG C TTG ACT TTG AGC AGG AGG CA	51,9	1 : 1600
Hsc70/54-F ** Hsc70/54-R **	TGG ATG TCA CTC CTC TTT CC ACT TGG TTG GCT TAA TCA ACC	54,0	1 : 100
Hsp75-F Hsp75-R	CAT CCA CCT GAA ATC CGA CT GCG ACG TAG CGG TAG AAC TC	51,9	1 : 10
Lbp-F Lbp-R	CCA TTG AAA ACC CTG CTG AT ACA GCG CAA TGG TAG GTA GG	56,4	1 : 100
MDH1-F MDH1-R	ATC CAG CCA ATA CCA ACT GC GAG GAA TGG TTT CCC CAG AT	50,0	1 : 800
p47-F p47-R	GCA GAA AAT GAA GCC AAA GC CAG CTC TTT GTT CGG GAA AG	56,4	1 : 100
PDC-F PDC-R	AAG CTT CAG CTT TGG CAT GT GTA AAA GTG CCA CCC TGG AA	50,0	1 : 300

PK-M2-F	CTA TCC TCT GGA GGC TGT GC	50,0	1 : 1600
PK-M2-R	CCA GAC TTG GTG AGG ACG AT		
RbP0-F	AAC AAC CCA GCT CTG GAG AA	65,9	1 : 6400
RbP0-R	TGC CCC TGG AGA TTT TAG TG		
TCP-1ε-F	GAT GGC TGA GAT TGC TGT GA	58,8	1 : 300
TCP-1ε-R	TTG GTT TGG GTG GTT CAA AT		
β-Actin-F	ATT GGC AAT GAG CGG TTC CG	56,4	1 : 6400
β-Actin-R	TGC TGA TCC ACA TCT GCT GG		

(* Scharte M, et al., 2003; ** Tsukahara F, et al., 2000)

2.9.6.2. Durchführung der Polymerasekettenreaktion (PCR)

- Die aus der Reversen Transkription erhaltenen cDNA-Proben wurden auf Eis aufgetaut.
- Die benötigten Reaktionsgefäße wurden auf einer Kühlplatte vorbereitet.
- Die cDNA-Proben wurden entsprechend der für die jeweilige zu amplifizierende Sequenz durchgeführten Verdünnungsreihen verdünnt.
- Jeweils 2 µl der verdünnten cDNA-Proben wurden auf Eis in die vorbereiteten PCR-Cups vorgelegt.
- Je nach Anzahl (n) der Proben wurde folgender PCR-Mastermix auf Eis angesetzt:
 - 11,5 µl RNase-freies Wasser (n+1)
 - + 2 µl 10xPCR-Puffer (n+1)
 - + 2 µl dNTP-Lösung (2 mM) (n+1)
 - + 1 µl Vorwärts-Primer (n+1)
 - + 1 µl Rückwärts-Primer (n+1)
 - + 0,5 µl Taq DNA Polymerase (n+1)
- Die Lösung wurde auf dem Vortexer kurz und gut gemischt und bei 4°C abzentrifugiert.
- Anschließend wurde auf Eis in jedes vorbereitete PCR-Cup vorsichtig 18 µl des PCR-Mastermixes pipettiert und durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette gut durchmischt.

- Das PCR-Gerät wurde gestartet und folgendes Programm gewählt:

1. Start	95°C	2 min	2.-4.: 30 Zyklen
2. Denaturierung	95°C	1 min	
3. Anlagerung der Primer	Temperatur abhängig von den Primern	1 min	
4. Verlängerung der Primer	72°C	2 min	
5. Ende	4°C	∞	

- Die Proben wurden erst in das PCR-Gerät gestellt, wenn die Blocktemperatur 90°C erreicht hatte.
- Nach Abschluss der PCR wurden die Proben entweder zur Auftrennung in einem Agarose-Gel weiter bearbeitet, oder im Kühlschrank bei 4°C zwischengelagert.

2.9.7. *Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte*

Zur Auftrennung und anschließenden Detektion der amplifizierten DNA-Fragmente wurde eine Agarosegel-Elektrophorese durchgeführt. Dabei ist die Konzentration der Agarose von der erwarteten Länge der DNA-Fragmente abhängig. In der vorliegenden Arbeit wurden Konzentrationen von 1,7 % und 2,0 % Agarose eingesetzt, entsprechend erwarteter Fragmentlängen von 0,2 bis 2,5 kb bzw. 0,1 bis 2 kb. Als Elektrophoresepuffer wurde ein Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) eingesetzt.

Zur Färbung der DNA wurde der Fluoreszenz-Farbstoff Ethidiumbromid verwendet, der in der DNA interkaliert und unter UV-Bestrahlung fluoresziert. Das Ethidiumbromid wurde direkt in die geschmolzene Agarose pipettiert, um langwierige Färbungen und anschließende Entfärbungen zu vermeiden.

Vor dem Auftragen der DNA-Proben wurden diese mit Probenpuffer versetzt, der die Aufgabe hat, einerseits durch die Anwesenheit von Polysucrose 400 (Ficoll 400) die Dichte der Proben zu erhöhen und damit ein sicheres Auftragen zu ermöglichen und andererseits durch die Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol den Verlauf der Elektrophorese beobachtbar zu machen. Bromphenolblau läuft in den gewählten Agarose-Konzentrationen bei ca. 80 – 100 bp und Xylencyanol bei 800 – 900 bp.

Die angelegte Spannung wurde jeweils nach Größe des Gels mit ca. 10 V pro cm Laufstrecke gewählt. Die Stromstärke wurde auf maximal 100 mA begrenzt.

2.9.7.1. Materialien und Chemikalien

Geräte und Materialien

Gelgießstände	Easy-Cast (klein, mittel, groß)	Owl Scientific
Probenkämme	Easy-Cast (8, 14, 20 Geltaschen)	Owl Scientific
Elektrophorese-Apparaturen	Easy-Cast (klein, mittel, groß)	Owl Scientific
Netzgerät	Consort E 321	Fröbel Labortechnik
Microwelle		Sharp
Tischzentrifuge	Biofuge fresco (Rotor #3765, r (max): 7,3 cm)	Heraeus

Lösungen und Chemikalien

Proben-Puffer (6-fach)	125 mg	Bromphenolblau	Sigma
	125 mg	Xylencyanol	Roth
	7,5 g	Ficoll 400	Sigma
	ad 50 ml	MilliQ-H ₂ O	
<i>à 1 ml aliquotiert</i>		Lagerung: 2 – 8°C	
EDTA-Stammlösung (0,5 M, pH 8)	93,05 g	Na ₂ EDTA·2H ₂ O	Sigma
	ad 500 ml	MilliQ-H ₂ O	
		Salzsäure 37%	Roth
<i>pH-Wert eingestellt auf 8,0</i>			
Tris-Stammlösung (1 M, pH 8)	60,55 g	Tris-Base	Sigma
	ad 1000 ml	MilliQ-H ₂ O	
		NaOH	Sigma
<i>pH-Wert eingestellt auf 8,0</i>			
TAE-Puffer (50-fach)	242 g	Tris-Base	Sigma
	100 ml	EDTA-Stammlösung (0,5 M, pH 8)	
	57,1 ml	Essigsäure 100 %	Merck
	ad 1000 ml	MilliQ-H ₂ O	
TAE-Puffer (1-fach)	20 ml	TAE-Puffer (50-fach)	
	ad 1000 ml	MilliQ-H ₂ O	
TE-Puffer	10 mM Tris	10 ml	Tris-Stammlösung (1 M, pH 8)
	1 mM EDTA	2 ml	EDTA-Stammlösung (0,5 M, pH 8)
		ad 1000 ml	DEPC-H ₂ O

100-Basenpaare-Marker	100 µl	100 Base-Pair Ladder	Amersham Biosciences
	150 µl	Proben-Puffer (6-fach)	
	750 µl	TE-Puffer	
Agarose	SeaKem Agarose		Cambrax
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg/ml		Roth

2.9.7.2. Durchführung der elektrophoretischen Auftrennung der PCR-Produkte

- Zunächst wurden die PCR-Produkte auf Eis mit jeweils 4 µl des Probenpuffers (6-fach) versetzt und durch mehrmaliges Aufziehen mit der Pipette gut durchmischt.
- Je nach Größe des zu gießenden Gels wurde Agarose in folgenden Volumina TAE-Puffer (1-fach) gelöst, indem die Lösung in der Microwelle erhitzt und solange geschwenkt wurde, bis keine ungelösten Agarose-Partikel mehr sichtbar waren:

Kleines Gel: 50 ml

Mittleres Gel: 75 ml

Großes Gel: 100 ml

- Die Agarose-Konzentration betrug je nach Länge der Sequenz der erwarteten PCR-Produkte 1,7 % oder 2,0 %.
- Die heiße und noch flüssige Agarose-Lösung wurde mit 1 µl Ethidiumbromid-Lösung pro 100 ml Agarose/TAE-Lösung versetzt, in den entsprechenden Gelgießstand gefüllt und die Probenkämme eingesetzt. Nach ca. 45 – 60 min war das Gel fest und abgekühlt und konnte in die entsprechende Elektrophorese-Apparatur eingesetzt werden.
- Es wurde soviel TAE-Puffer (1-fach) eingefüllt, dass das Gel gerade mit Puffer überschichtet war.
- Anschließend wurden die Probenkämme entfernt und 7 µl des 100-Basenpaare-Markers und je 10 µl der PCR-Proben in die entstandenen Geltaschen pipettiert.
- Die Elektrophorese-Apparatur wurde verschlossen, an das Netzgerät angeschlossen und die Elektrophorese unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Spannung: 10 V/cm Gel

Stromstärke: max. 100 mA

- Die Elektrophorese war abgeschlossen, wenn die Bromphenolblau-Front das Ende des Gels erreicht hatte.

2.9.8. Detektion und Auswertung der aufgetrennten PCR-Produkte

Die Detektion und Auswertung der mit Ethidiumbromid gefärbten PCR-Produkte erfolgte computergestützt mithilfe einer UV-Quelle, einer digitalen Kamera mit Vergrößerer und entsprechender Software.

2.9.8.1. Materialien

Geräte

UV-Quelle		Fröbel Labortechnik
Kamera und Vergrößerer	Vilber Lourmat	Fröbel Labortechnik
Computer	Pentium 4	MaxData
	Amilo K7600, 1.86 GHz, 480 MB RAM	Futjisu Siemens

Software

Kamerasoftware	BioCaptMW Version 11.01	
Auswertungssoftware	ImageJ 1.31v	National Institutes of Health, USA

2.9.8.2. Durchführung der Detektion und Auswertung der aufgetrennten PCR-Produkte

- Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das jeweilige Agarosegel unter UV-Licht betrachtet, mithilfe einer mit einem Vergrößerer kombinierten Digitalkamera und der Software BioCaptMW auf den Bildschirm projiziert.
- Nach Einstellung verschiedener Parameter wie Bildausschnitt, Bildschärfe, Blende und Belichtungszeit wurde das jeweilige Gel fotografiert und im TIF-Format abgespeichert.
- Jedes digitalisierte Agarosegel wurde mit dem Programm ImageJ geöffnet und zunächst der Hintergrund entfernt.
- Daraufhin wurde der Bereich des Gel, in dem die auszuwertenden DNA-Banden lagen, markiert und für die Analyse ausgewählt (Abb. 2.9 (A)).

- Die Intensitäten der Banden wurden dann berechnet und graphisch dargestellt (Abb. 2.9 (B)).

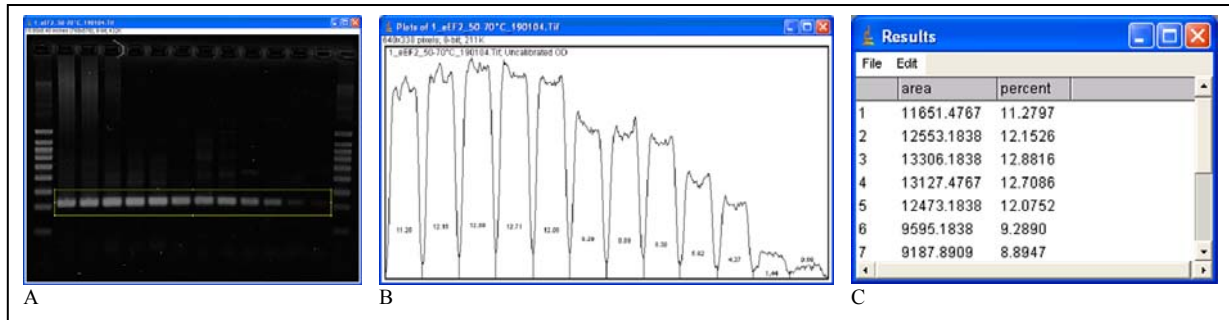


Abb. 2.9: (A) Markierung und Auswahl der zu analysierenden DNA-Banden. (B) Graphische Darstellung der Intensität der einzelnen DNA-Banden. (C) Ergebnisse der Flächenberechnung der einzelnen Peaks als absolute Zahlen und in Relation zur Gesamtintensität als Prozentangabe.

- Anschließend wurden die Flächen der Peaks, die für die einzelnen Banden stehen, berechnet. Als Ergebnisse wurden entweder die Flächen als absolute Zahlen ausgedrückt, oder aber als prozentuale Anteile der Gesamtfläche des Graphen, um Ergebnisse verschiedener Gele, die zum Beispiel aufgrund der Färbung unterschiedliche Gesamtintensitäten zeigen, miteinander vergleichen zu können (Abb. 2.9 (C)).

2.10. Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

2.10.1. Überblick

Unter „Elektrophorese“ ist die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld zu verstehen. Dabei hängt die sogenannte elektrophoretische Beweglichkeit von folgenden Kriterien ab:

- Nettoladung der Teilchen
- Größe und Gestalt
- Porengröße des Trägermaterials
- pH-Wert und Ionenstärke des Puffersystems
- elektrische Feldstärke
- Temperatur.

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Polypeptide nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das anionische Tensid Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich proportional zum Molekulargewicht an die Proteine an, wobei die negative Ladung des gebundenen Detergenz soweit überwiegt, dass die Eigenladungen der Proteine keinen Einfluss auf das Gesamtsystem haben. Daher ist die elektrophoretische Beweglichkeit der SDS-Protein-Komplexe allein von ihrer Größe und der Porengröße der Gelmatrix abhängig. Aus

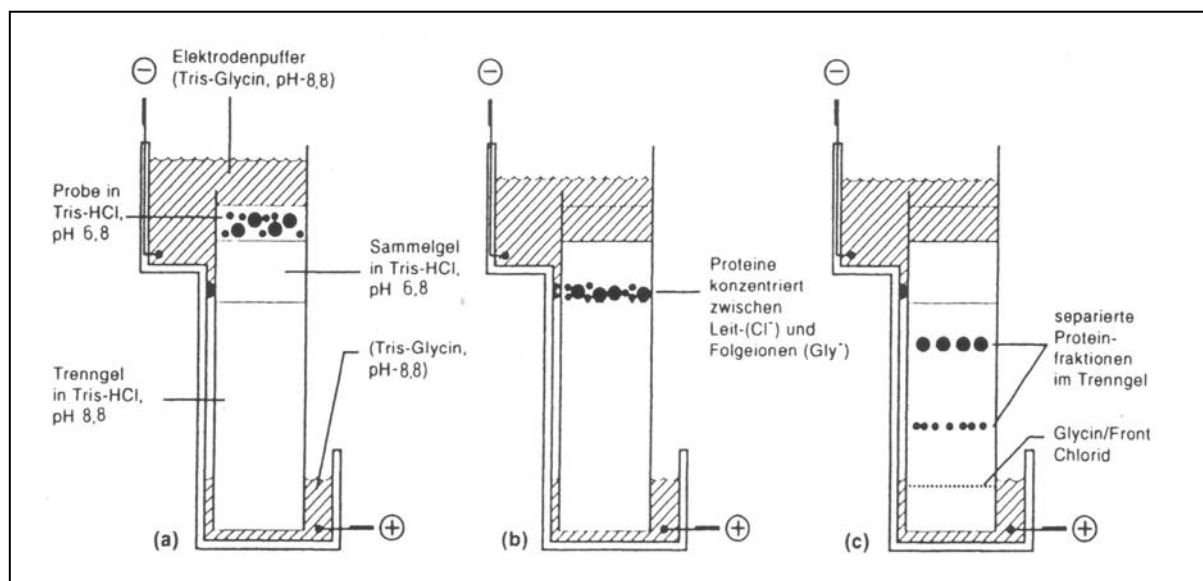


Abb. 2.10: Bei der diskontinuierlichen SDS-PAGE wird die Protein-Probe auf ein weitporigen Sammelgel zwischen Cl⁻-Ionen als Leitonen und Glycin-Ionen als Folgeionen aufgetragen. Im elektrischen Feld werden die Proteine im Sammelgel in einer schmalen Bande konzentriert. Erst nach dem Übertritt in das Trenngel werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht in diskrete Banden aufgetrennt (nach Hames 1990).

der negativen Nettoladung der SDS-Protein-Komplexe resultiert die anodenorientierte Wanderungsrichtung.

Die Acrylamid-Konzentration der Trenngele liegt üblicherweise zwischen 5 und 15 %. Bei der Auftrennung von SDS-denaturierten Proteinen besteht innerhalb eines bestimmten Bereichs (ca. 12 – 80 kDa) eine lineare Beziehung zwischen dem \log_{10} des Molekulargewichts (in Dalton) und der relativen Mobilität R_f , die sich aus dem Quotienten Wanderungsstrecke des Proteins / Wanderungsstrecke Lauffront errechnet.

Eine relativ einfache und häufig genutzte Methode der eindimensionalen SDS-PAGE ist das diskontinuierliche System nach Laemmli (Laemmli UK, 1970). Dabei ist sowohl die Gelstruktur diskontinuierlich, weil sich das Gel aus einem großporigen Sammelgel und einem engporigen Trenngel zusammensetzt, als auch das Puffersystem, bei dem sich pH-Wert, Art und Konzentration der Ionen in den Puffern unterscheiden. Der Laufpuffer enthält Tris-Glycin bei einem pH-Wert von 8,8, der Proben- und der Sammelgelpuffer haben einen pH-Wert von 6,8, während der Trenngelpuffer wiederum auf einen pH-Wert von 8,8 eingestellt ist. Bei dieser Anordnung der Puffersysteme (Abb. 2.10) wandern nach Anlegen einer Spannung als erste die Cl^- -Ionen als sogenannte Leitonen in Richtung Anode, während das Glycin bei einem leicht sauren pH-Wert hauptsächlich als Zwitterion ($^+\text{NH}_3\text{CH}_2\text{COO}^-$) vorliegt und als sogenanntes Folgeion zunächst zurückbleibt. Zwischen Leit- und Folgeionen bildet sich eine Zone von geringer Ionendichte und damit hoher Feldstärke aus, sodass sich die SDS-Protein-Komplexe vor Eintritt in das Trenngel im Sammelgel in einer schmalen Zone sammeln können. Durch den Anstieg des pH-Werts im Trenngel verschiebt sich das Gleichgewicht der Glycin-Ionen hin zu Glycin-Anionen ($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COO}^-$), die die Proteine im elektrischen Feld überholen. Letztere werden im Trenngel dann entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt.

2.10.2. *Materialien und Chemikalien*

Geräte und Materialien

Gelgießstand	Dual Gel Caster Mighty Small SE 245	Hoefer
Glasplatte	10 x 10 cm	Hoefer
Porzellanplatte	10 x 10 cm	Hoefer
Probenkamm	10 Geltaschen	
Elektrophorese-Apparatur	Mighty Small SE 250 / SE 260	Hoefer
Netzgerät	Mighty Slim SX 250 Power Supply	Hoefer
Thermoblock	Dri-Block® DB·2D	Techne
Tischzentrifuge	Biofuge fresco (Rotor #3765, r (max): 7,3 cm)	Heraeus

Lösungen und Chemikalien

Sammelgelpuffer (4-fach)	3 g ad 50 ml	Tris-Base MilliQ-H ₂ O Salzsäure 37%	Sigma Roth
<i>pH-Wert eingestellt auf 6,8</i>			
Trenngelpuffer (4-fach)	36,3 g ad 200 ml	Tris-Base MilliQ-H ₂ O Salzsäure 37%	Sigma Roth
<i>pH-Wert eingestellt auf 8,8</i>			
Acrylamid/bis-Acrylamid-Lösung	30%		Sigma
SDS-Lösung	5 g ad 50 ml	Natriumdodecylsulfat (SDS) MilliQ-H ₂ O	Sigma
APS-Lösung	1 g ad 10 ml	Ammoniumpersulfat MilliQ-H ₂ O	Sigma
<i>à 250 µl aliquotiert</i>			Lagerung: – 20°C
Tetramethylethyldiamin (TEMED)			Sigma
Lysepuffer (2-fach)	50 ml 4 g 20 ml 10 ml 500 µg ad 100 ml	Tris-SDS-Lösung pH 6,8 SDS Glycerol 2-Mercaptoethanol Bromphenolblau MilliQ-H ₂ O	Sigma Roth Bio-Rad Sigma
Laufpuffer	12,1 g 7,5 g 1,0 g ad 1000 ml	Tris-Base Glycin SDS MilliQ-H ₂ O	Sigma Fluka Sigma
Full-range Rainbow MW-Marker	RPN800		Amersham Biosciences

2.10.3. Durchführung der SDS-PAGE nach Laemmli

2.10.3.1. Gelzusammensetzung

	Sammelgel	Trenngel 12,5 %
Acrylamid-Lösung	670 µl	4,16 ml
Trenngelpuffer (4-fach)	%	2,5 ml
Sammelgelpuffer (4-fach)	1,25 ml	%
SDS-Lösung 10 %	50 µl	100 µl
MilliQ-H ₂ O	3 ml	3,18 ml
APS-Lösung	25 µl	50 µl
TEMED	4 µl	10 µl
Endvolumen:	5 ml	10 ml

2.10.3.2. Herstellung von Trenn- und Sammelgel

- Zunächst wurden die Komponenten des Trenngels nach obigem Rezept zusammenpipettiert und gut gemischt. Dabei war darauf zu achten, dass das TEMED erst als letzter Bestandteil hinzugefügt wurde (Start der Polymerisation). Anschließend wurde das noch flüssige Trenngel mit einer Spritze über eine Kanüle blasenfrei bis ca. 2,5 cm unterhalb der Oberkante in die Gelkammer gefüllt.
- Um zu verhindern, dass die Polymerisation an der Oberfläche durch Luftsauerstoff (Radikalfänger) gehemmt wird, und um noch dazu eine glatte Trennfläche zwischen Trenn- und Sammelgel zu erreichen, war die Trenngellösung mit ca. 1 ml Ethanol abs. zu überschichten.
- Nach Polymerisation des Trenngels (30 – 60 min) konnte der Ethanol abs. wieder entfernt werden. Die Komponenten des Sammelgels wurden zusammengemischt und vorsichtig mit Spritze und Kanüle in die Gelkammer über das Trenngel gespritzt. Danach wurde der Probenkamm eingesetzt, um Geltaschen zum Auftragen der Proteinproben zu formen. Die Polymerisationsdauer betrug ebenfalls ungefähr 30 – 60 min.
- Um ein Eintrocknen des Sammelgels zu verhindern, wurde nach Abschluss der Polymerisation das fertige Gel in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt, der Laufpuffer eingefüllt und nach Markierung der Geltaschen der Probenkamm entfernt.

2.10.3.3. Probenvorbereitung

- Die Proteinproben wurden mit dem 2-fach-Lysepuffer im Verhältnis 1:1 gemischt, für 5 min bei 95°C im Thermoblock erhitzt und anschließend kurz bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert.
- Pro Geltasche wurden jeweils 40 µg Gesamtprotein bei einem maximalen Volumen von 20 µl aufgetragen.
- Vom Rainbow-Marker wurden jeweils 7 µl in die Geltaschen pipettiert.

2.10.3.4. Auftrennung der Proteine durch Elektrophorese

- Die Elektrophorese-Kammer wurde an das Netzgerät angeschlossen und die Elektrophorese bei konstanter Spannung von 120 V und variabler Stromstärke gestartet.
- Die Elektrophorese dauerte im Durchschnitt zwei bis drei Stunden und war beendet, wenn die Bromphenolblau-Front den unteren Rand des Gels erreicht hatte.
- Die so aufgetrennten Proteine wurden nicht im Gel angefärbt, sondern durch elektrophoretischen Proteintransfer („Western-Blot“) auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Einzelne Proteine wurden darauf mit Hilfe von speziellen Antikörpern immunochemisch detektiert.

2.11. Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf Nitrocellulose-Membranen (Western-Blotting)

2.11.1. Überblick

Der Transfer von Proteingemischen nach Auftrennung durch die SDS-PAGE auf eine synthetische Membran wurde 1979 von H. Towbin et al. beschrieben (Towbin H, et al., 1979). Diese Methode erhielt eigentlich zum Scherz die Bezeichnung „Western-Blotting“ (Burnette WH, 1981), nachdem die entsprechende Methode zum Transfer von DNA-Fragmenten (Southern EM, 1975) nach Ed Southern „Southern-Blotting“ und die Methode zum RNA-Transfer (Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR, 1977) „Northern-Blotting“ genannt wurde. Wenn sich an den Protein-Transfer eine immunochemische Detektion bestimmter Antigene auf dem Protein-Blot anschließt, wird dies allgemein „Immun(o)blotting“ genannt (Towbin H, Gordon J, 1984; Heegard NHH, Bjerrum OJ, 1989).

Es gibt im wesentlichen zwei verschiedene Techniken zum Protein-Transfer auf synthetische Membranen: (a) das Tank- oder Nasszellen-Blotting und (b) das Filter- oder SemiDry-Blotting.

Beim Tank- oder Nasszellen-Blotting (Towbin H, et al., 1979; Bittner M, et al., 1980; Burnette WH, 1981) ist das Gel-Transfermembran-Sandwich vertikal zwischen Filterpapieren, Schaumstoffschwämmen und Platindraht-Elektroden angeordnet. Der elektrophoretische Transfer wird in einem großen Puffertank mit entsprechend großen Puffermengen (3 – 5 l) durchgeführt. Durch Art und Abstand der Elektroden ist für einen effektiven Transfer eine relativ hohe Stromstärke und elektrische Leistung notwendig, sodass der Wärmeentwicklung mit einer entsprechenden Kühlung des Puffers begegnet werden muss. Die üblichen Transferzeiten betragen mehrere Stunden bis über Nacht.

Das Filter- oder SemiDry-Blotting-Verfahren mit einem diskontinuierlichen Puffersystem wurde 1984 von J. Kyhse-Andersen entwickelt (Kyhse-Andersen J, 1984). Dieses Verfahren hat gegenüber dem Tank- oder Nasszellen-Blotting-Verfahren gewisse Vorteile. Man benötigt nur ein geringes Puffervolumen, da sich die Puffermenge auf die getränkten Filterpapiere zwischen den Elektroden beschränkt (daher SemiDry-Blotting). Außerdem wird aufgrund der Geometrie und des geringen Abstandes der Elektroden ein relativ starkes und homogenes elektrisches Feld bei geringer Stromstärke und Leistung erreicht, sodass sich die Transferzeit verkürzt (1 – 3 h) und eine Kühlung nicht unbedingt notwendig ist. Ein weiterer Vorteil ist, dass verschiedene Puffer nebeneinander eingesetzt werden können, um die Effizienz des Transfers zu verbessern.

2.11.2. Materialien und Chemikalien

Geräte und Materialien

SemiDry-Blotgerät	16 x 20 cm Elektroden	Biometra
Netzgerät	MightySlim SX 250 Power Supply	Hoefer
Nitrocellulose-Membran	Hybond-C extra Proteinbindungskapazität 80 – 100 µg/cm ²	Amersham Biosciences
Filterpapier		Schleicher und Schuell
Plastikschalen	(entsprechend der Gelgröße)	
Pinzette		

Lösungen und Chemikalien

Anodenpuffer I	42,28 g ad 1000 ml	Tris-HCl MilliQ-H ₂ O Salzsäure 37% NaOH	Sigma Roth Sigma
<i>pH-Wert eingestellt auf 10,4</i>			
Anodenpuffer II	3,94 g ad 1000 ml	Tris-HCl MilliQ-H ₂ O Salzsäure 37% NaOH	Sigma Roth Sigma
<i>pH-Wert eingestellt auf 10,4</i>			
Kathodenpuffer	3,94 g 5,24 g ad 1000 ml	Tris-HCl Norleucin MilliQ-H ₂ O Salzsäure 37% NaOH	Sigma Sigma Roth Sigma
<i>pH-Wert eingestellt auf 9,4</i>			
Ponceau S-Lösung	0,1 % Panceaurot S Concentrate		Sigma
NaN ₃ -Lösung 1 %	500 mg ad 50 ml	NaN ₃ MilliQ-H ₂ O	Sigma
Magermilch/ NaN ₃ -Lösung	5 g 2 ml ad 100 ml	Magermilchpulver NaN ₃ -Lösung 1 % MilliQ-H ₂ O	Saliter

2.11.3. *Durchführung des Western-Blots nach dem SemiDry-Verfahren*

- Das vom Sammelgel abgetrennte Trenngel aus der eindimensionalen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (1D-SDS-PAGE) oder der ausgeschnittene Gelbereich aus der zweidimensionalen SDS-PAGE (2D-SDS-PAGE) wurde zunächst für ca. 5 min im Kathodenpuffer inkubiert.
- Währenddessen wurden pro Transfer die Nitrocellulose-Membran und sieben Filterpapiere auf die entsprechende Größe des Gels zugeschnitten.
- Drei Filterpapiere wurden mit Kathodenpuffer, zwei mit Anodenpuffer I und zwei mit Anodenpuffer II getränkt. Dabei war darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen an den Filterpapieren bildeten.
- Die Transfereinheit wurde wie folgt auf der Anode des SemiDry-Blotgeräts aufgebaut und mit der Kathode abgedeckt:
 - **Kathode** (oben)
 - 3 Filterpapiere getränkt mit Kathodenpuffer
 - Gel
 - Nitrocellulose-Membran (mit Anodenpuffer II befeuchtet)
 - 2 Filterpapiere getränkt mit Anodenpuffer II
 - 2 Filterpapiere getränkt mit Anodenpuffer I
 - **Anode** (unten)

Die Filterpapiere, die Membran und das Gel wurden der Reihe nach einzeln mit Handschuhen oder Pinzette aufeinandergelegt und eventuelle Lufteinschlüsse jeweils durch Rollen mit einem 15 ml-Falcon-Tube entfernt.

- Der Transfer erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 200 mA. Dabei stellte sich eine Spannung von 4 – 6 V ein. Der Transfer wurde im Regelfall nach ca. 2 h beendet.
- Anschließend wurde die Nitrocellulose-Membran in Ponceau-S-Lösung für ca. 1 min inkubiert und mit MilliQ-H₂O gespült, um den Erfolg des Proteintransfers zu prüfen und die Position der Lauffront mit einem wasserfesten Stift zu markieren.
- Nach weiterem zwei- bis dreimaligem Spülen wurde die Membran bis zur immunochemischen Detektion in Magermilch/NaN₃-Lösung bei ca. 4°C gelagert.

2.12. Nachweis von Proteinen auf Blot-Membranen durch immunochemische Detektion mit dem ECL-System

2.12.1. Überblick

Bei immunochemischen Nachweisen von Proteinen macht man sich die Tatsache zu nutze, dass Proteine meist mehrere antigene Determinanten (Epitope) besitzen, mit denen entsprechende Antikörper über Bindungsstellen (Paratope) in den Komplementarität-determinierenden Regionen (CDRs) in Wechselwirkung treten können. Das bedeutet, dass die räumlichen Strukturen und Ladungsverteilungen von Epitop und Paratop nach dem „Schlüssel-Schloss-Prinzip“ zueinander passen. Die Bindungen zwischen Antigen und Antikörper sind von nicht-kovalenter Art, das heißt sie werden über Wasserstoff-Brücken-Bindungen, van-der-Waals-Kräfte, hydrophobe und ionische Wechselwirkungen gebildet.

Die Affinität ist ein Maß für die Bindungsstärke *eines* Paratops an *ein* Epitop und ist über die Affinitätskonstante wie folgt definiert:

$$K_A = [Ak-Ag] / [Ak] * [Ag].$$

Dabei steht die molare Konzentration des Antikörper-Antigen-Komplexes [Ak-Ag] im chemischen Gleichgewicht mit der molaren Konzentration der freien Antikörper [Ak] bzw. der freien Antigenbindungsstellen (Paratope) und der molaren Konzentration der freien Epitope [Ag]. Die Werte von K_A liegen normalerweise zwischen 10^5 M^{-1} (niedrig-affin) und 10^{11} M^{-1} (hoch-affin). Da Antikörper jedoch mehrere Paratope besitzen (IgG = 2, IgA = 4, IgM = 10) und außerdem polyklonale Antiseren aus verschiedenen Antikörpern gegen ein komplexes Antigen mit unterschiedlichen Epitopen bestehen, kann es zu bi- und multivalenten Bindungen zwischen Antigen und Antikörper kommen. Der Begriff Avidität beschreibt die Gesamtstabilität solcher multimerer Komplexe. Bei polyklonalen Antiseren wird für die Gesamtreaktivität des Antikörpergemischs häufig der Titer angegeben, der theoretisch für die Summe aller Einzelaaffinitäten der jeweiligen gegen die verschiedenen Epitope des Antigens gerichteten Antikörper steht. Polyklonale Antikörper erkennen mit ihren Valenzen (Paratopen) verschiedene Epitope eines Antigens und besitzen daher eine höhere Avidität als monoklonale Antikörper, die bei vergleichbarer Affinität nur an eine einzige antigene Determinante (Epitop) binden können.

Bei dem immunologischen Nachweis mit dem ECL („enhanced chemiluminescence“)-System (Whitehead TP, et al., 1983; Thorpe GHG, Kricka, LJ, 1986; Hodgson M, Jones P, 1989; Constantine NT, et al., 1994) handelt es sich um einen indirekten zweistufigen Nachweis mit einem unmarkierten Antigen-spezifischen Primärantikörper und einem Peroxidase-konjugierten Spezies-spezifischen Anti-IgG-Sekundärantikörper.

Die optimale Konzentration sowohl des jeweiligen Primärantikörpers, als auch des Sekundärantikörpers muss für jedes Antigen in Vorversuchen durch entsprechende Verdünnungsreihen so ermittelt werden, dass mit minimalen Konzentrationen deutliche Signale mit möglichst geringem Hintergrund erzeugt werden. Die Antikörper werden normalerweise mit einer sogenannten Blockierungslösung (siehe unten!) verdünnt. Die Waschschritte mit Detergenz-haltigen Puffern, die sich sowohl an die Inkubation des Primärantikörpers, als auch an die des Sekundärantikörpers anschließen, dienen der möglichst vollständigen Entfernung von nicht-gebundenen oder unspezifisch gebundenen Antikörpern.

Als letzter Schritt der immunochemischen Detektion wird die Bande oder der Spot des Proteins, an das der entsprechende Primärantikörper mit Peroxidase-konjugiertem Sekundärantikörper gebunden hat, sichtbar gemacht. Dies geschieht mithilfe des Luminophors Luminol (3-Aminophthalhydrazid) (Roswell DF, White EH, 1978). Dabei wird dieses Molekül Peroxidase-katalysiert mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) unter alkalischen Bedingungen über mehrere Zwischenstufen und Abspaltung von Stickstoff (N_2) (Thorpe GHG, Kricka, LJ, 1986; Durrant I, 1990) zu einem kurzlebigen, energiereichen cyclischen Peroxid oxidiert. Beim Zerfall dieses Peroxids wird Energie frei, die zur Anregung der beiden entstehenden Carbonylbindungen führt. Mit dem dadurch emittierten Licht werden Röntgenfilme belichtet, auf denen nach der Entwicklung die Banden oder Spots sichtbar sind und sogar densitometrisch ausgewertet werden können.

Beim ECL-System werden bestimmte Substanzen, besonders para-substituierte Phenole, eingesetzt, die durch Reaktionen mit den Enzymzwischenstufen die Chemilumineszenz um über das 1000-fache verstärken und auf einige Stunden verlängern. Das Maximum der Intensität ist dabei schon nach 10 bis 15 min erreicht. Das ECL-System ist ein sehr empfindliches Detektionsverfahren, sodass es unabdingbar ist, mögliche unspezifische Hintergrundreaktionen zu vermeiden. Daher sollten alle unspezifischen Bindungsstellen für die immunologischen Reagenzien auf der Membran möglichst vollständig abgesättigt oder „blockiert“ sein. Man geht dabei nach zwei Prinzipien vor:

1. Unspezifische Bindungsstellen werden mit irrelevanten Proteinen blockiert, die keine Reaktionen mit den immunochemischen Reagenzien zeigen, zum Beispiel Magermilchpulver (Johnson DA, et al., 1984; Bers G, Garfin D, 1985) oder heterologe Seren, wie fetales Kälberserum oder Pferdeserum (Towbin H, et al., 1979; Hawkes R, et al., 1982; Towbin H, Gordon J, 1984).
2. Hydrophobe Wechselwirkungen der Reaktanden mit der Membran werden durch nichtionische Detergenzien, wie Tween 20 (Blatteiger B, et al., 1982; Bers G, Garfin D, 1985), blockiert.

Oft wird zur Blockierung eine Kombination aus heterologem, unspezifischem Protein und nichtionischem Detergenz eingesetzt (Spinola SM, Cannon JG, 1985; Baldo BA, Torey ER, Ford SA, 1986).

Die mit Protein beladenen Membranen können für einige Tage in Blockierungslösungen bei ca. 4°C gelagert werden, dann sollte aber 0,02 % Natriumazid (NaN₃) als Konservierungsmittel gegen Pilze und Bakterien zugesetzt werden.

2.12.2. Materialien und Chemikalien

Geräte und Materialien

Kippschüttler	Duomax 1030	Heidolph
Plastikschalen	(entsprechend der Gelgröße)	
Pinzette		
Parafilm	4 Inch breit	American National Can™
Folienschlauch		
Folienschweißgerät	Polystar 243 M	
Röntgenfilm	Hyperfilm-ECL	Amersham Biosciences
Röntgenkassette	X-Ray Cassette 24 x 30 cm	Rego, Augsburg
Plastiktäfelchen		
Entwicklungsgerät für Röntgenfilme		Agfa

Lösungen und Chemikalien

TBS-Puffer <i>pH-Wert eingestellt auf 7,5</i>	15,76 g	Tris-HCl	Sigma
	8,77 g	NaCl	Sigma
	ad 1000 ml	MilliQ-H ₂ O	
		Salzsäure 37%	Roth
		NaOH	Sigma
TBST-Puffer <i>pH-Wert eingestellt auf 7,5</i>	15,76 g	Tris-HCl	Sigma
	8,77 g	NaCl	Sigma
	500 µl	Tween 20	Sigma
	ad 1000 ml	MilliQ-H ₂ O	
		Salzsäure 37%	Roth
		NaOH	Sigma
Blockierlösung	5 g	Magermilchpulver	Saliter
	ad 100 ml	TBS-Lösung	
Antikörperlösung I (Primärantikörper)	Verdünnung (Antikörper-abhängig) in Blockierlösung		
Antikörperlösung II (Sekundärantikörper)	Verdünnung (Antikörper-abhängig) in Blockierlösung		

Detektionsreagenzien	ECL Plus Western Blotting Detection System	Amersham Biosciences
Sammelgelpuffer (4-fach)	3 g ad 50 ml	Tris-Base MilliQ-H ₂ O Sigma
Stripplösung	2 g 40 ml 400 µl ad 50 ml	SDS Sammelgelpuffer 2-Mercaptoethanol Sammelgelpuffer Bio-Rad
NaN ₃ -Lösung 1 %	500 mg ad 50 ml	NaN ₃ MilliQ-H ₂ O Sigma
Magermilch/ NaN ₃ -Lösung	5 g 2 ml ad 100 ml	Magermilchpulver NaN ₃ -Lösung 1 % MilliQ-H ₂ O Saliter

Eingesetzte Antikörper

Primärantikörper (Ak I)					
Bezeichnung	Antigen	Isotyp	Klon	Verdünnung	
Anti-Enolase (polyklonal)	Enolase α, β und γ (human)	Ziege, IgG		1 : 200 bis 1 : 500	Santa Cruz Biotechnology
Anti-Hsc70 (monoklonal)	Heat shock cognate protein (Hsc) 70 und 54 (human)	Ratte, IgG _{2a}	1B5	1 : 1000 bis 1 : 10.000	StressGen Biotechnologies
Anti-Hsp75/ TRAP1 (monoklonal)	Heat shock protein (Hsp) 75 bzw. Tumor necrosis factor receptor- associated protein (TRAP) 1	Maus, IgG ₁	30	1 : 5000 bis 1 : 6000	BD Biosciences
Anti-p47 (polyklonal)	p47 (human)	Kaninchen		1 : 5000 bis 1 : 20.000	Meyer HH, et al., 2000

Sekundärantikörper (Ak II)

Bezeichnung	Antigen	Herkunft	Verdünnung	
Anti-Rat IgG Horseradish Peroxidase (HRPO) Conjugate (polyklonal)	Gesamt-IgG (Ratte)	Kaninchen	1 : 2000 bis 1 : 20.000	StressGen Biotechnologies
Anti-Rabbit IgG HRPO Conj. (polyklonal)	Gesamt-IgG (Kaninchen)	Ziege	1 : 5000 bis 1 : 20.000	Jackson Immuno Research
Anti-Mouse IgG HRPO Conj. (polyklonal)	Gesamt-IgG (Maus)	Ziege	1 : 20.000	Dianova
Anti-Goat IgG HRPO Conj. (polyklonal)	Gesamt-IgG (Ziege)	Kaninchen	1 : 2000	Dianova

2.12.3. Durchführung der immunochemischen Detektion

- Nach Entnahme der Membran aus der Magermilch/ NaN_3 -Lösung wurde sie zweimal 5 min in TBST-Lösung gewaschen.
- Anschließend wurde die Nitrocellulose-Membran über 30 min in Blockierlösung geschwenkt.
- Ohne weiteren Waschschrift wurde die Membran 2 h lang bei Raumtemperatur auf dem Kippschüttler in der Antikörperlösung I inkubiert. Dafür wurde die Membran in Folie an zunächst drei Seiten eingeschweißt, die Antikörperlösung I über die vierte offene Seite eingefüllt, Luftblasen entfernt und an der vierten Seite zugeschweißt.
- An diesen Inkubationsschritt schlossen sich drei Waschschriffe mit TBST-Lösung über jeweils 5 min an.
- Die Inkubation in der Antikörperlösung II wurde über 45 min bei Raumtemperatur auf dem Kippschüttler durchgeführt.
- Die Membran wurde daraufhin noch dreimal über jeweils 20 min mit TBST-Lösung gewaschen.
- Die Membran wurde auf ein Plastiktäfelchen entsprechender Größe gelegt. Überschüssige TBST-Lösung wurde mit saugfähigem Papier vorsichtig entfernt.
- Die Komponenten der ECL-Plus-Detektionslösung wurden im angegebenen Verhältnis von 40 : 1 gemischt und so auf die Membran pipettiert, dass sie vollständig mit der Detektionslösung benetzt war. Die Inkubation unter Lichtausschluss dauerte 10 min.
- Anschließend wurde die Detektionslösung mit saugfähigem Papier wieder von der Membran entfernt und diese mit Parafilm überzogen.

- Die Membran wurde in der Dunkelkammer auf einen Röntgenfilm gelegt, über die benötigte Belichtungszeit belichtet und sofort entwickelt.
- Optional konnten die Antikörper durch Inkubation der Membran in Stripplösung für 30 min bei 60°C entfernt werden („stripping“). Dadurch konnte die Membran für eine weitere immunochemische Detektion mit eventuell anderen Antikörpern genutzt werden.
- Anschließend wurde die Membran wieder in Magermilch/ NaN_3 -Lösung bei ca. 4°C gelagert.

2.13. Statistik

Da für alle statistischen Berechnungen normalverteilte Stichproben angenommen werden konnten, wurden die Ergebnisse der Untersuchungen mit zweiseitigen t-Tests nach Student auf statistische Signifikanz geprüft. Zur Prüfung der Varianzen wurden die Daten einem F-Test ($\alpha = 0,05$) unterzogen. Die Berechnungen erfolgten mit dem Programm Microsoft Excel® 2000.

Die einzelnen Testgruppen wurden immer mit der jeweiligen Kontrollgruppe verglichen, deren Mittelwert prozentual als Ausgangswert mit 100 % angegeben wurde.

Bei der RT-PCR zur Untersuchung der mRNA-Expression wurden die einzelnen Testgruppen mit den jeweiligen β -Actin-Kontrollgruppen in Relation gesetzt.

3. Ergebnisse

3.1. Vitalitätsänderungen der Neuroblastom-Zelllinie KELLY unter dem Einfluss verschiedener NSAR

Zunächst wurde mithilfe von MTT-Tests untersucht, ob und in welchem Ausmaß nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) die Vitalität von Neuroblastomzellen verändern. Dafür wurden Zellen der Neuroblastom-Zelllinie KELLY mit zunächst drei verschiedenen NSAR, die sowohl die Cyclooxygenase-1 (Cox-1), als auch die Cox-2 hemmen, behandelt. Ziel dieser Untersuchungen war es, aus den drei Substanzen Acetylsalicylsäure (ASS), Flufenaminsäure und Sulindac den Wirkstoff mit den deutlichsten Effekten zu ermitteln.

Für jeden Wirkstoff wurden 14 unterschiedliche Konzentrationen zwischen 0 und 1200 μM untersucht. Für jede Konzentration eines Wirkstoffs wurden 6 Zellproben ($n = 6$) angesetzt. Die Dauer der Behandlung belief sich auf jeweils 12 h.

Dabei wurde deutlich, dass unter dem Einfluss von Flufenaminsäure die deutlichsten Effekte zu beobachten waren (Abb. 3.1).

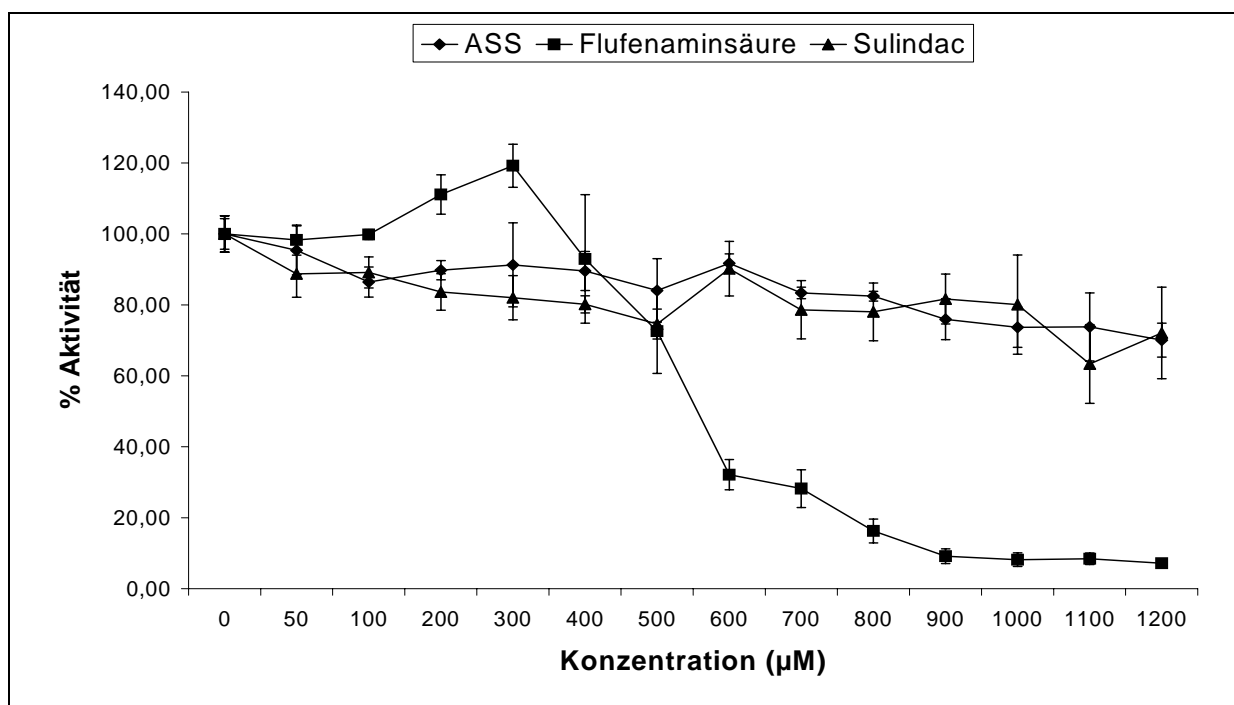


Abb. 3.1: Bei der Untersuchung der Vitalität bzw. Aktivität der Zellen der Neuroblastom-Zelllinie KELLY mithilfe von MTT-Tests zeigten die NSAR ASS, Flufenaminsäure und Sulindac nach einer Behandlungszeit von 12 h unterschiedliche Effekte. Während unter dem Einfluss von ASS und Sulindac die Aktivität mit steigender Konzentration nur mäßig auf ca. 70 % bei 1200 μM zurückging, war durch Flufenaminsäure schon ab einer Konzentration von 500 μM ein deutlicher Aktivitätsverlust zu verzeichnen.

Unter Flufenaminsäure war für die Vitalität der Neuroblastomzellen mit steigender Konzentration zunächst ein leichter Anstieg zu beobachten. Ab einer Konzentration von 500 μM nahm die Aktivität jedoch stark ab.

In weiteren Versuchsreihen wurden die Vitalitätsänderungen der Neuroblastomzellen unter Flufenaminsäure nicht nur in Abhängigkeit der Konzentration, sondern auch der Zeit untersucht. Dabei wurden die Zellproben wieder mit 14 verschiedenen Konzentrationen zwischen 0 und 1200 μM behandelt. Für jede Konzentration wurden 6 Zellproben ($n = 6$) angesetzt. Der schon beschriebenen Versuchsreihe für Flufenaminsäure über 12 h wurden noch drei Versuchsreihen über 3 h, 6 h und 9 h hinzugefügt, die deutlich machen sollten, ob und wie die Effekte der Flufenaminsäure auf die Aktivität der Neuroblastomzellen nicht nur von der Konzentration, sondern auch von der Zeit abhängig sind (Abb. 3.2).

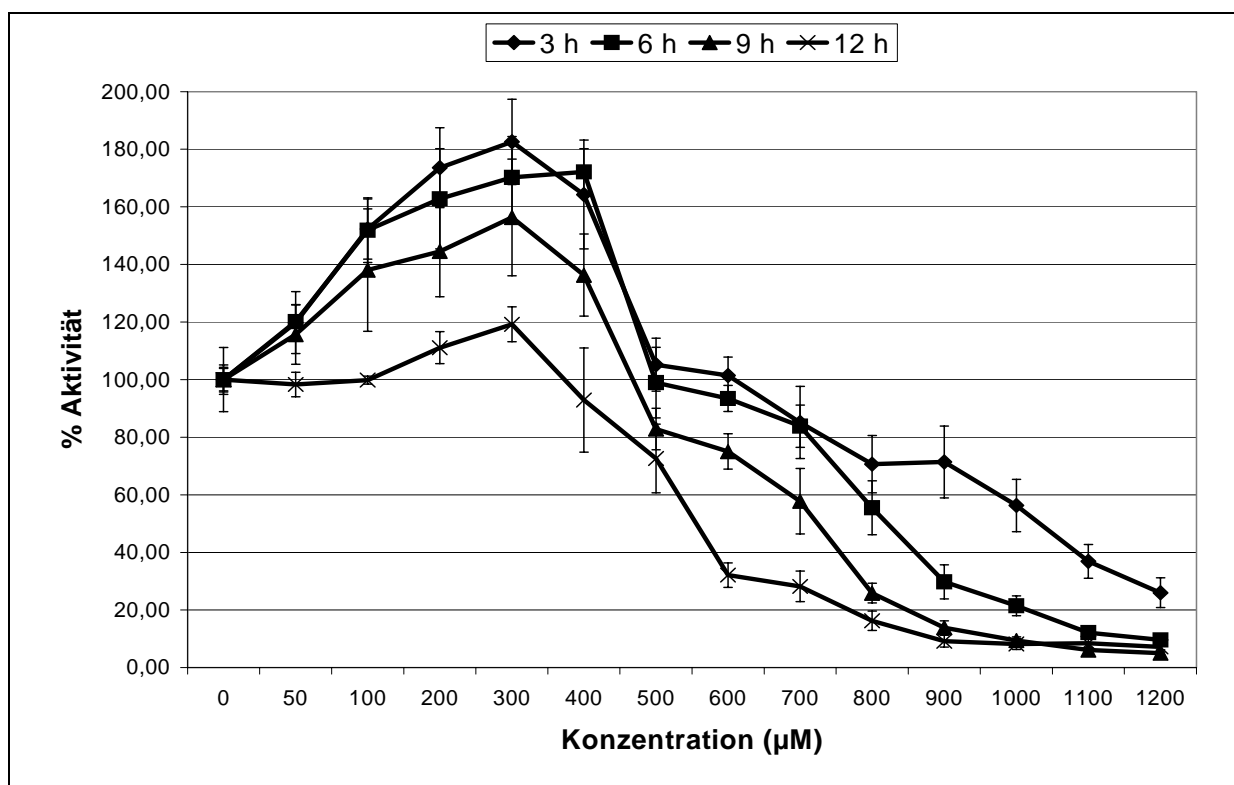


Abb. 3.2: Die Vitalität bzw. Aktivität der Neuroblastomzellen ist abhängig von der Konzentration der Flufenaminsäure und von der Behandlungszeit.

Die Aktivität der Zellen nahm zunächst je nach Behandlungszeit bis zu 300 μM Flufenaminsäure unterschiedlich stark zu. Dabei korrelierte eine kürzere Behandlungszeit mit einer stärkeren Aktivitätszunahme. Ab Flufenaminsäure-Konzentrationen von 400 bzw. 500 μM war für alle vier Versuchsreihen eine deutliche relative Aktivitätsabnahme zu beobachten. Aufgrund dieser Versuche wurde Flufenaminsäure als Modellschubstanz für weitere Untersuchungen bezüglich der Wirkung von unselektiven NSAR auf die Apoptose und Proteinexpression von Neuroblastomzellen ausgewählt. Da bei allen Versuchen bei 500 μM Flufenaminsäure ein deutlicher Effekt auf die Vitalität der Zellen zu beobachten war, wurde die Flufenaminsäure in weiteren Versuchen häufig in dieser Konzentration eingesetzt.

3.2. Morphologische Veränderungen unter Einfluss von Flufenaminsäure

Zur Untersuchung der Auswirkung von Flufenaminsäure auf die Morphologie der Neuroblastomzellen wurden diese in Kultur ab einer Konfluenz von ca. 80 % mit Flufenaminsäure in Konzentrationen zwischen 10 und 1000 μM über 3 h, 6 h, 9 h, 12 h und 24 h behandelt. Nach Abschluss der jeweiligen Behandlungszeit wurden die Zellen mithilfe eines Lichtmikroskops betrachtet und photographiert (Abb. 3.3 – 3.7).

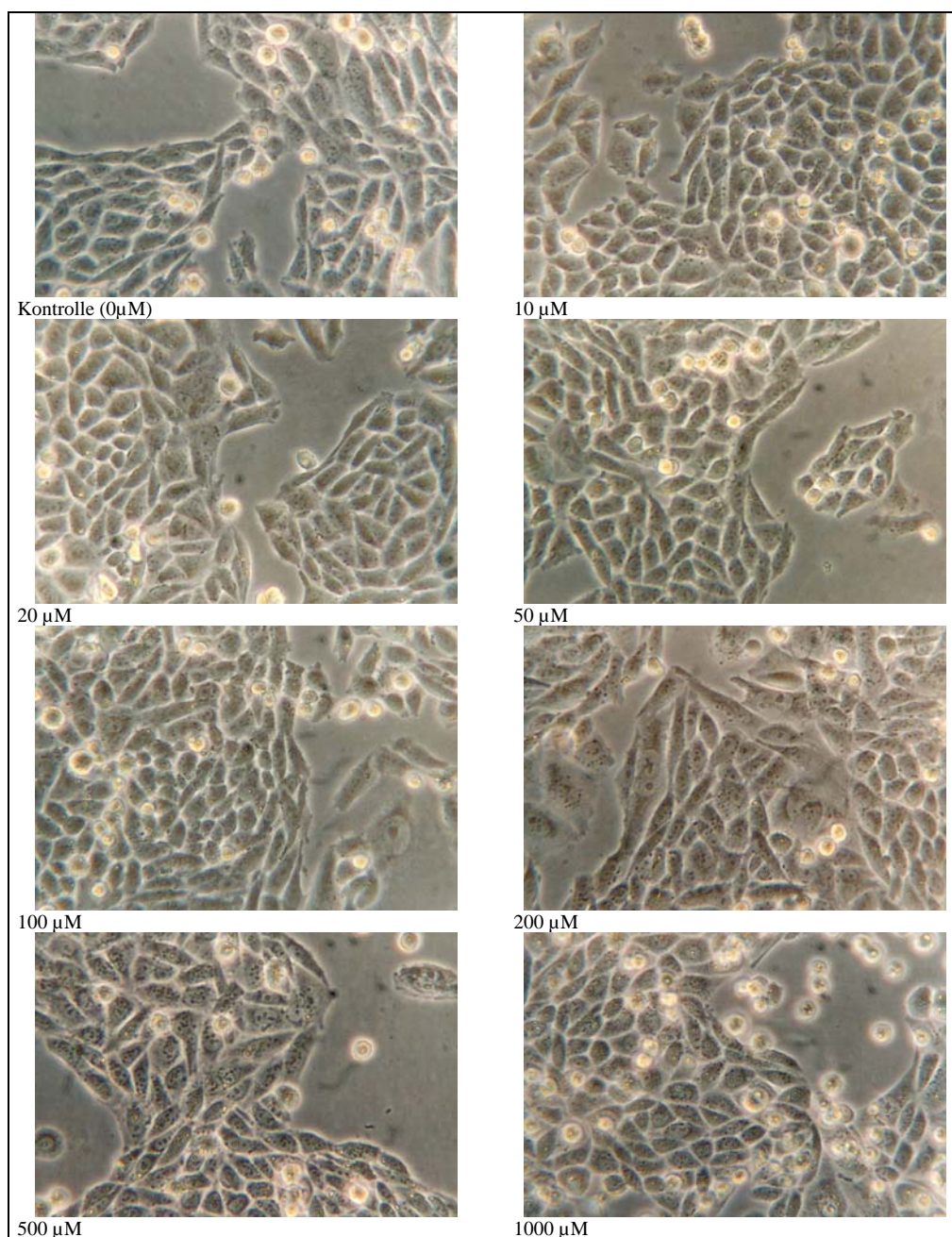


Abb. 3.3: Lichtmikroskopische Aufnahmen adhäsiver Zellen der Neuroblastom-Zelllinie KELLY nach Behandlung mit Flufenaminsäure in steigenden Konzentrationen bis 1000 μM . Die Aufnahmen wurden nach einer Behandlungszeit von 3 h gemacht.

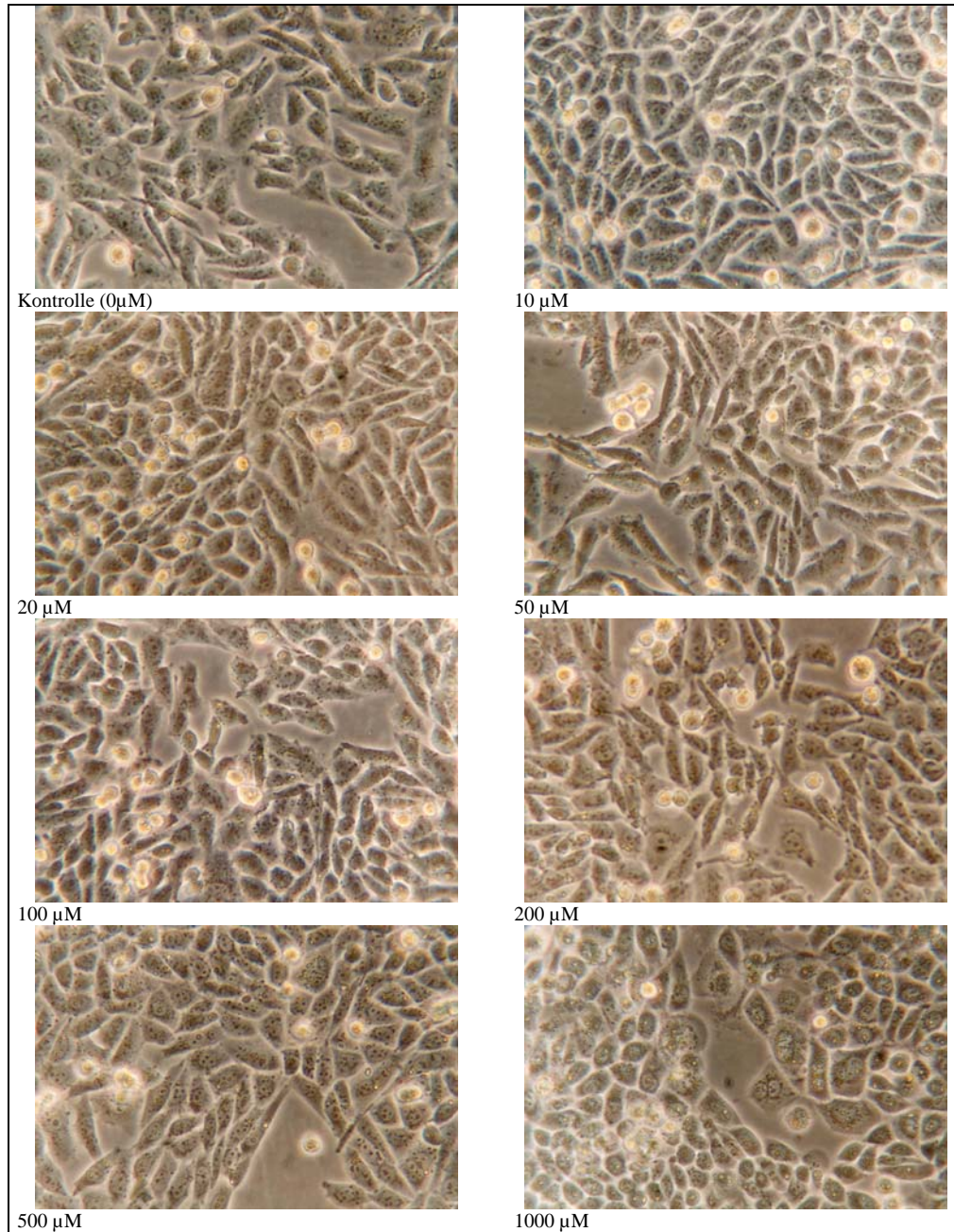


Abb. 3.4: Lichtmikroskopisch aufgenommene Neuroblastomzellen nach Behandlung mit Flufenaminsäure in Konzentrationen zwischen 10 und 1000 μ M über 6 h.

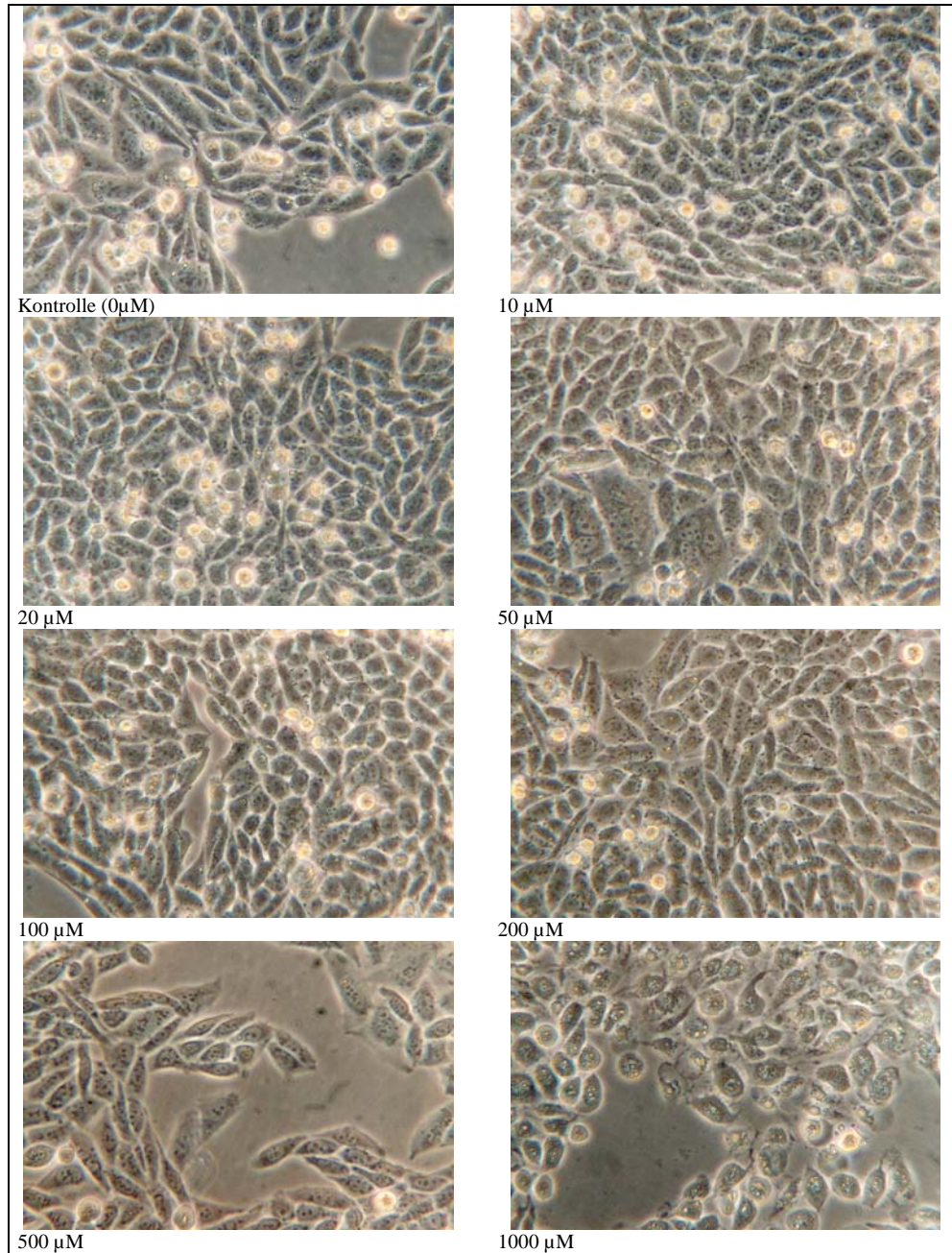


Abb. 3.5: Adhäsive Zellen der Neuroblastom-Zelllinie KELLY, die über 9 h mit steigenden Konzentrationen von Flufenaminsäure zwischen 10 und 1000 μ M behandelt wurden.

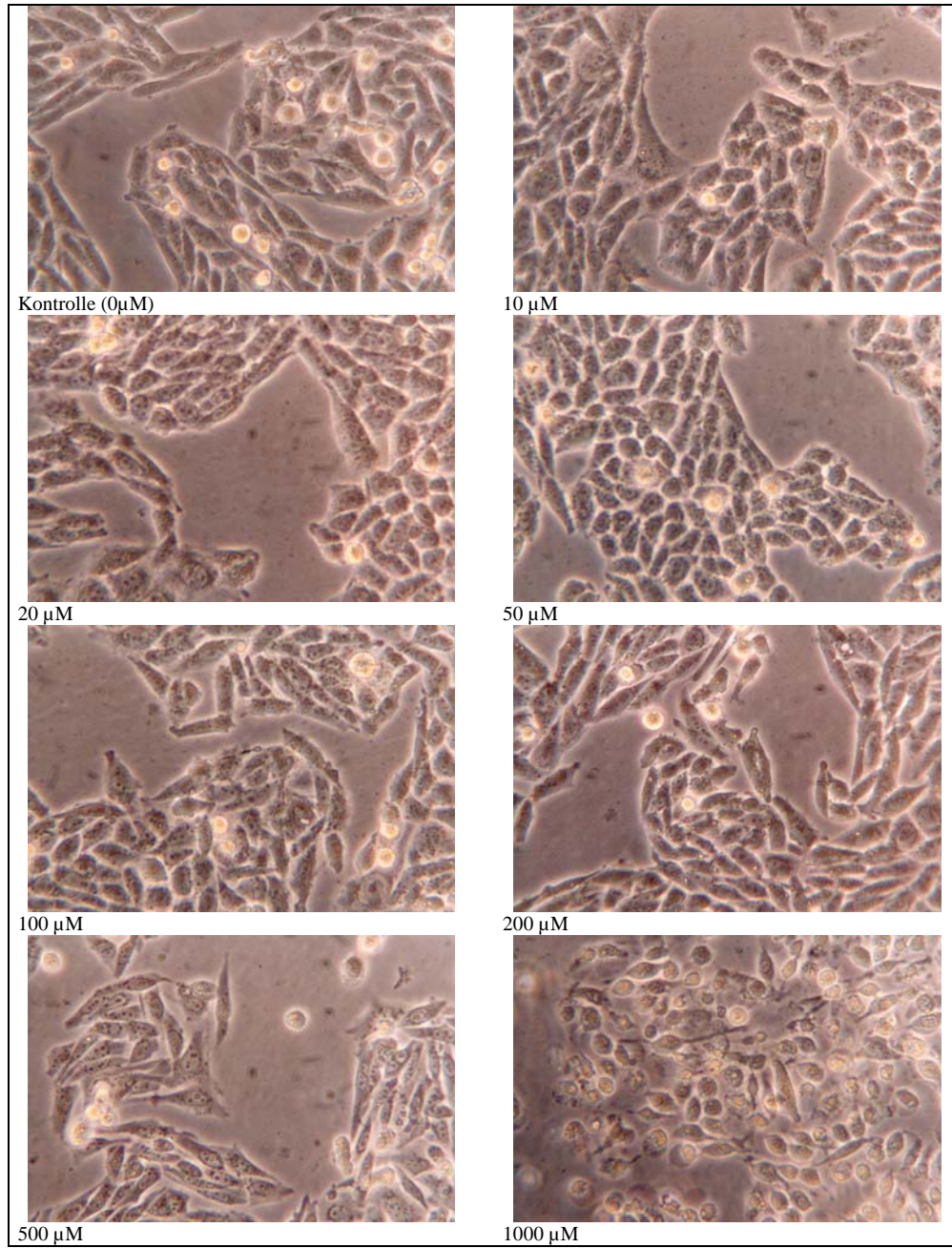


Abb. 3.6: Neuroblastomzellen nach einer Behandlungszeit von 12 h mit Flufenaminsäure in Konzentrationen zwischen 10 und 1000 µM.

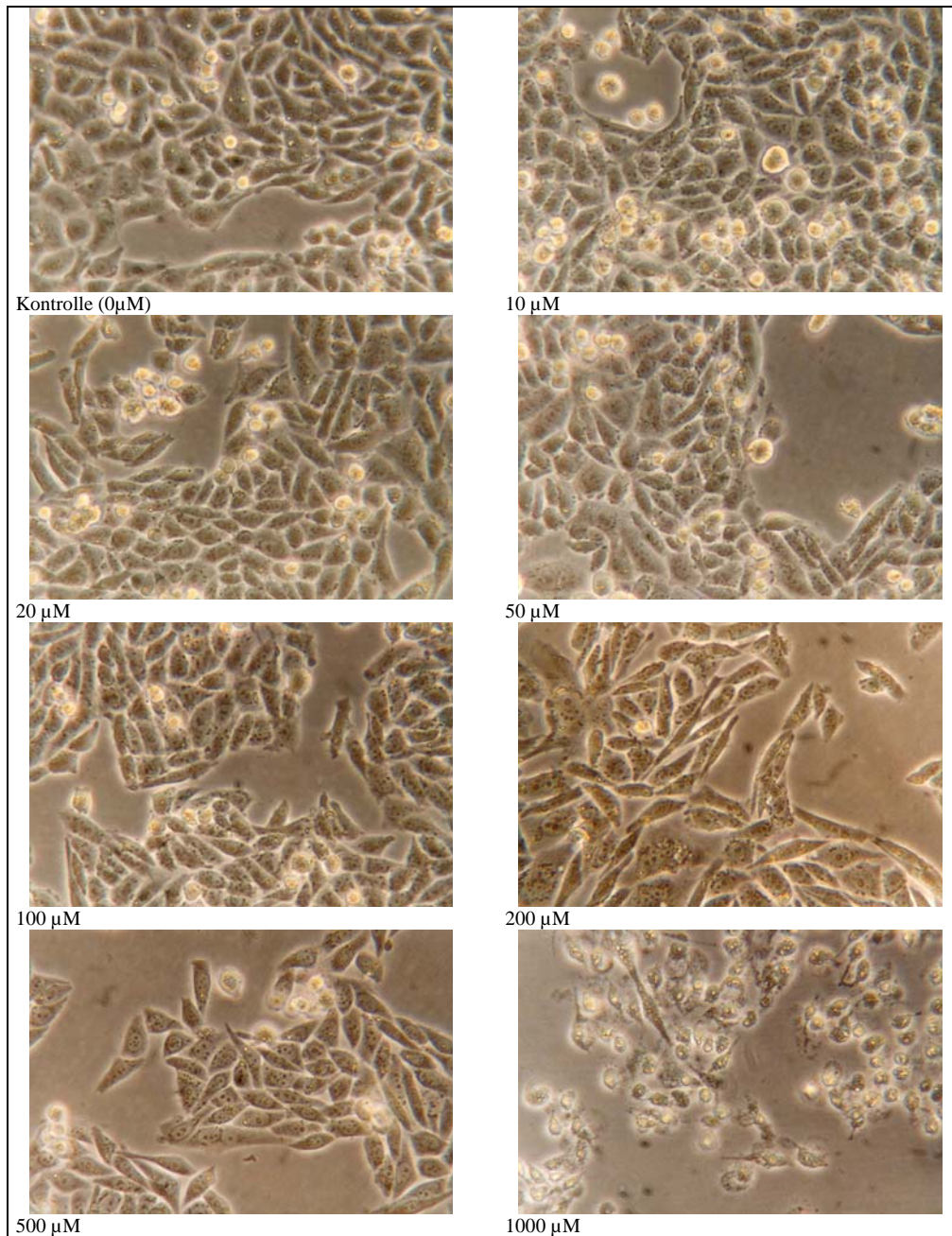


Abb. 3.7: Lichtmikroskopische Aufnahmen adhäsiver Zellen der Neuroblastom-Zelllinie KELLY nach Behandlung mit Flufenaminsäure in steigenden Konzentrationen bis 1000 µM. Die Aufnahmen wurden nach einer Behandlungszeit von 24 h gemacht.

Nach einer Behandlungszeit von 3 h waren für die Flufenaminsäure-Konzentrationen von 10 bis 500 μM lichtmikroskopisch keine Änderungen der Morphologie der Neuroblastomzellen im Vergleich zur Kontrolle erkennbar. Viele Zellen jedoch, die mit 1000 μM Flufenaminsäure behandelt wurden, zeigten im Gegensatz zu ihrer sonst eher spindelförmig gestreckten Zellform eine leichte Abrundung, was auf beginnende Prozesse hindeutet, die zum Untergang der Zellen führen (Abb. 3.3). Diese Abrundungen der Zellkörper waren bei längeren Behandlungszeiten von 6 h, 9 h und 12 h mit 1000 μM Flufenaminsäure immer deutlicher zu erkennen, während nach 24 h eher von Zelltrümmern als von Zellen gesprochen werden konnte (Abb. 3.4 – 3.7).

Auffällig war, dass sich die Zellformen der Neuroblastomzellen, die mit weniger Flufenaminsäure behandelt wurden, über alle Behandlungszeiten von 3 h, 6 h, 9 h, 12 h und 24 h nicht auffallend veränderten. Selbst Zellen mit der nächst niedrigeren Konzentration von 500 μM Flufenaminsäure behielten bis hin zu einer Behandlungszeit von 24 h ihre typische Morphologie. Allerdings war bei diesen Zellen ab 9 und mehr Stunden eine im Vergleich zur Kontrolle und zu Zellproben, die mit weniger Flufenaminsäure behandelt wurden, deutlich geringere Konfluenz zu beobachten, was auf eine Hemmung der Proliferation hindeutete (Abb. 3.5 – 3.7).

3.3. Apoptotische Prozesse unter dem Einfluss von Flufenaminsäure

3.3.1. *Acridinorange-/ Ethidiumbromid-Färbung*

Durch die Färbung von unfixierten Zellen mit den DNA-Fluoreszenzfarbstoffen Acridinorange und Ethidiumbromid (AO/EB-Färbung) können unter einem Fluoreszenzmikroskop anhand der Farbe und Morphologie lebende von apoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden werden. So sind lebende nicht-apoptotische Zellen (L) von Acridinorange mit, je nach Zellzyklus-Phase, mehr oder weniger strukturierter DNA grün gefärbt (Abb. 3.8 (A)). Lebende apoptotische Zellen (LA) weisen Ausstülpungen der Zellmembran auf („Blebbing“), verbunden mit kondensiertem und fragmentiertem Chromatin (Abb. 3.8 (B)). Tote apoptotische Zellen (TA) zeigen eine ähnliche Morphologie wie lebende apoptotische Zellen, sie sind nur orange gefärbt, da die Zellmembran ihre Integrität verloren hat und Ethidiumbromid eindringen kann, wodurch die Acridinorange-Färbung überdeckt wird (Abb. 3.8 (C)). Tote nekrotische oder nicht-apoptotische Zellen (TN) haben keine morphologischen Anzeichen von Apoptose und sind durch das eingedrungene Ethidiumbromid durchgehend orange gefärbt (Abb. 3.8 (D)).

An diesem Punkt sei darauf hingewiesen, dass es bei Untersuchungen der Apoptose schwer ist, den Zeitpunkt zu ermitteln, an dem eine Zelle wirklich „tot“ ist. Aus praktischen Gründen wurde daher in dieser Arbeit die übliche Unterscheidung „lebender“ und „toter“ Zellen anhand des Nachweises einer geschädigten Zellmembran, durch die Ethidiumbromid eindringen kann, getroffen. So werden alle grün gefärbten Zellen als „lebend“ und alle orange gefärbten als „tot“ klassifiziert.

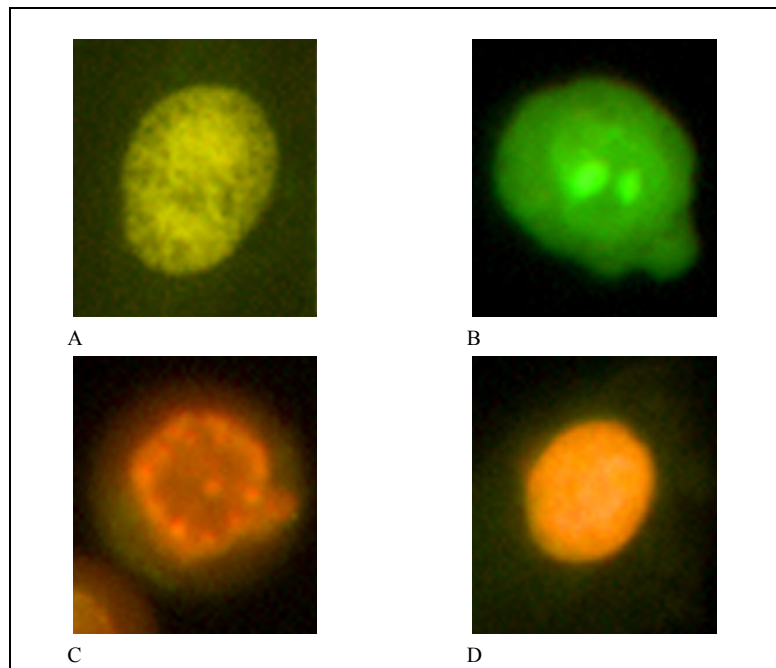


Abb. 3.8: Mit Acridinorange und Ethidiumbromid gefärbte Neuroblastomzellen der Zelllinie KELLY mit einem Fluoreszenzmikroskop vergrößert und aufgenommen: Lebende Zellen sind grün, tote orange gefärbt. A) Lebende nicht-apoptotische Zelle, B) lebende apoptotische Zelle mit kondensiertem Chromatin und Ausstülpung der Zellmembran, C) tote apoptotische Zelle und D) tote nicht-apoptotische bzw. nekrotische Zelle.

Um den Einfluss von Flufenaminsäure auf die Anteile von lebenden nicht-apoptotischen, lebenden apoptotischen, toten apoptotischen und toten nekrotischen Neuroblastomzellen zu untersuchen, wurden Zellproben der Neuroblastom-Zelllinie KELLY mit sieben Flufenaminsäure-Konzentrationen zwischen 10 und 1000 μM über 24 h behandelt.

Die verschiedenen Zellpopulationen (L, LA, TA und TN) wurden für jede Zellprobe der entsprechenden Flufenaminsäure-Konzentration dreimal nach den beschriebenen Kriterien ausgezählt.

Mit steigenden Flufenaminsäure-Konzentrationen veränderten sich die Anteile der lebenden nicht-apoptotischen, lebenden apoptotischen, toten apoptotischen und toten nekrotischen Neuroblastomzellen zum Teil sehr stark.

Der Anteil lebender nicht-apoptotischer Zellen wurde mit steigender Konzentration der Flufenaminsäure immer geringer. Während bei einer Konzentration von 500 μM ihr Anteil noch bei ca. 10 % lag, waren bei 1000 μM Flufenaminsäure keine intakten lebenden Neuroblastomzellen mehr zählbar (Abb. 3.9).

Der Anteil der lebenden apoptotischen Zellen nahm mit steigender Flufenaminsäure-Konzentration bis 200 μM auf knapp unter 80 % zu, während bei 500 μM ihr Anteil nur noch ungefähr die Hälfte betrug und bei 1000 μM sogar unter 5 % lag (Abb. 3.10). Dagegen war bei 500 μM Flufenaminsäure ein sprunghafter Anstieg des Anteils an toten apoptotischen Zellen zu beobachten, deren Anteil bei 1000 μM allerdings um ca. 10 % geringer war, da bei dieser hohen Konzentration ein Großteil der Zellen offensichtlich den nekrotischen Zelltod gestorben war (Abb. 3.11 und 3.12).

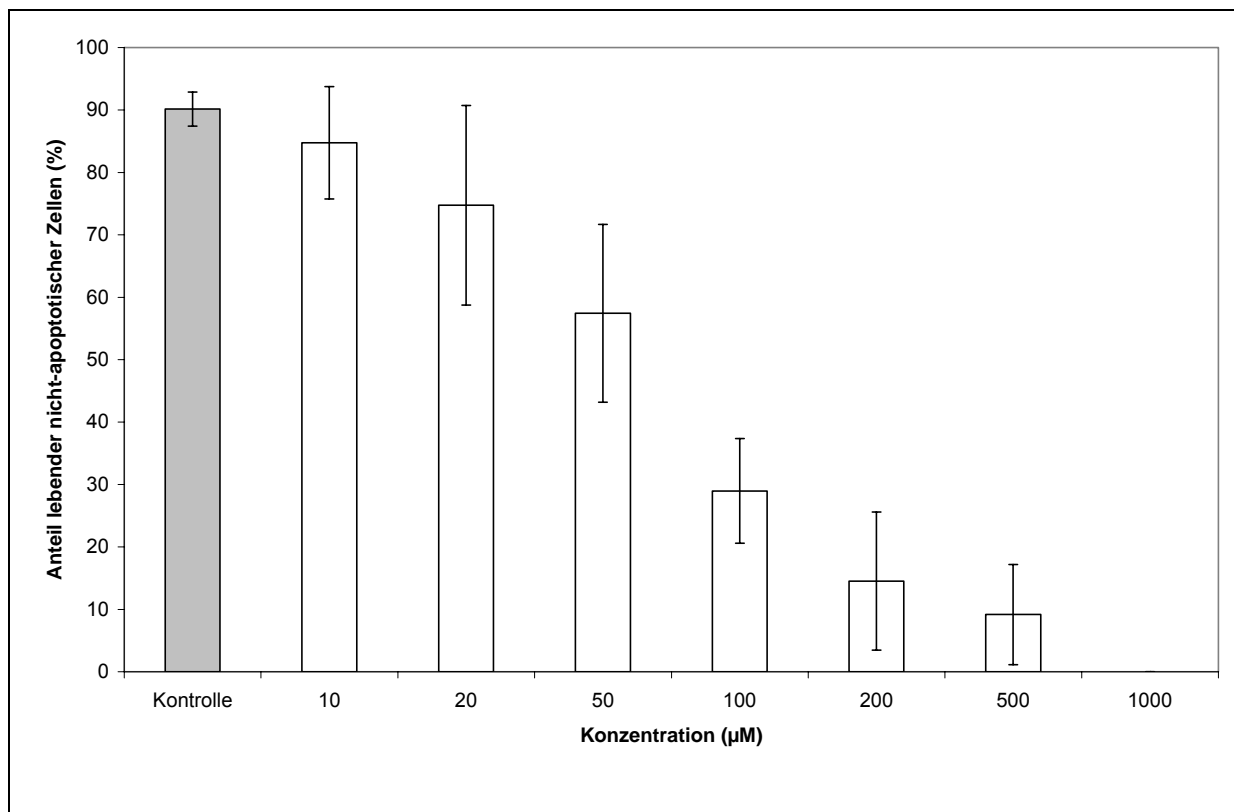


Abb. 3.9: Anteil lebender nicht-apoptotischer (L) Neuroblastomzellen nach einer Behandlungszeit von 24 h mit Flufenaminsäure in Konzentrationen von 10 bis 1000 μM .

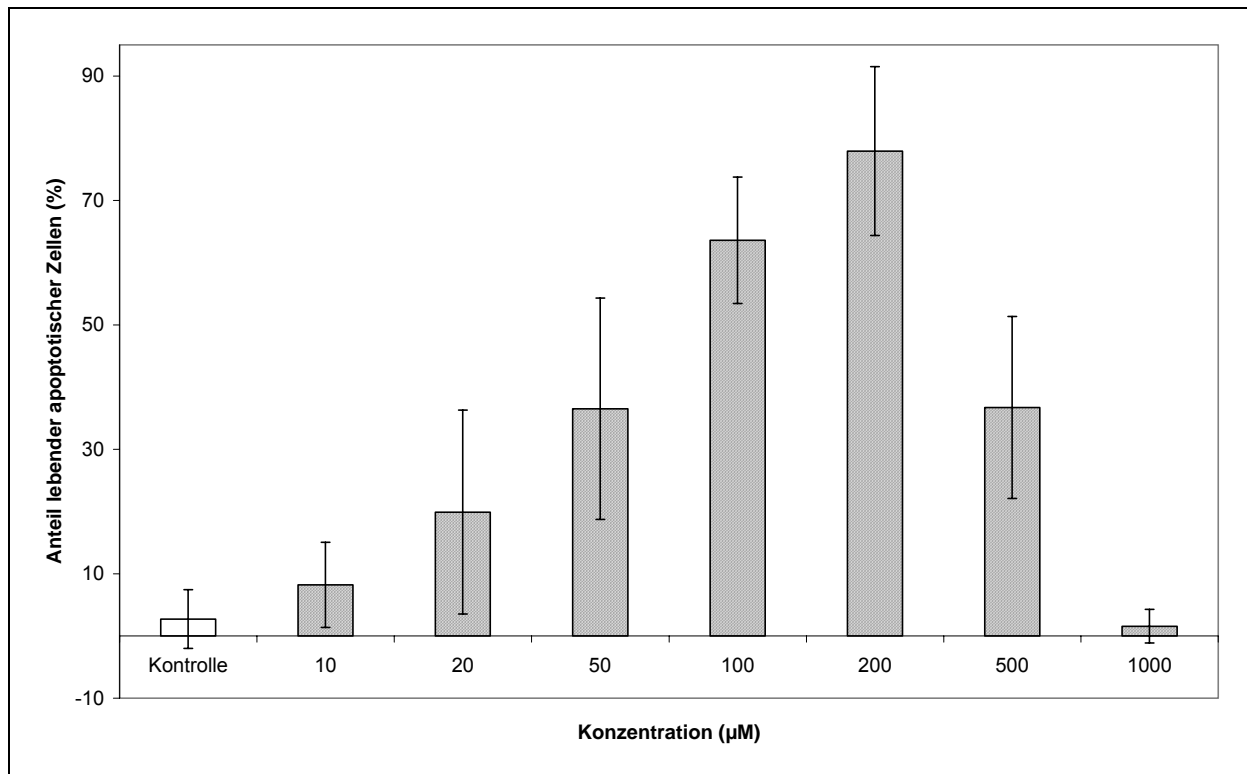


Abb. 3.10: Anteil lebender apoptotischer (LA) Neuroblastomzellen nach einer Behandlungszeit von 24 h mit Flufenaminsäure in Konzentrationen von 10 bis 1000 µM.

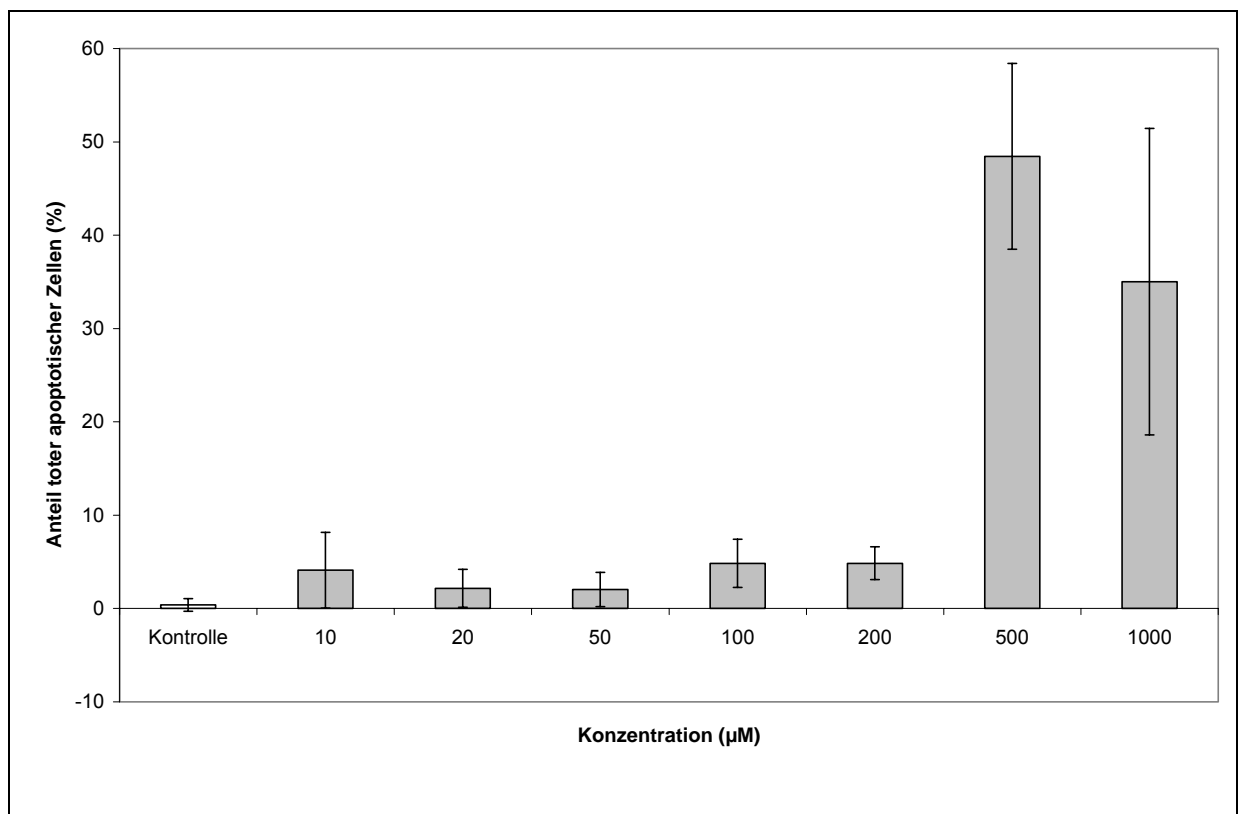


Abb. 3.11: Anteil toter apoptotischer (TA) Neuroblastomzellen nach einer Behandlungszeit von 24 h mit Flufenaminsäure in Konzentrationen von 10 bis 1000 µM.

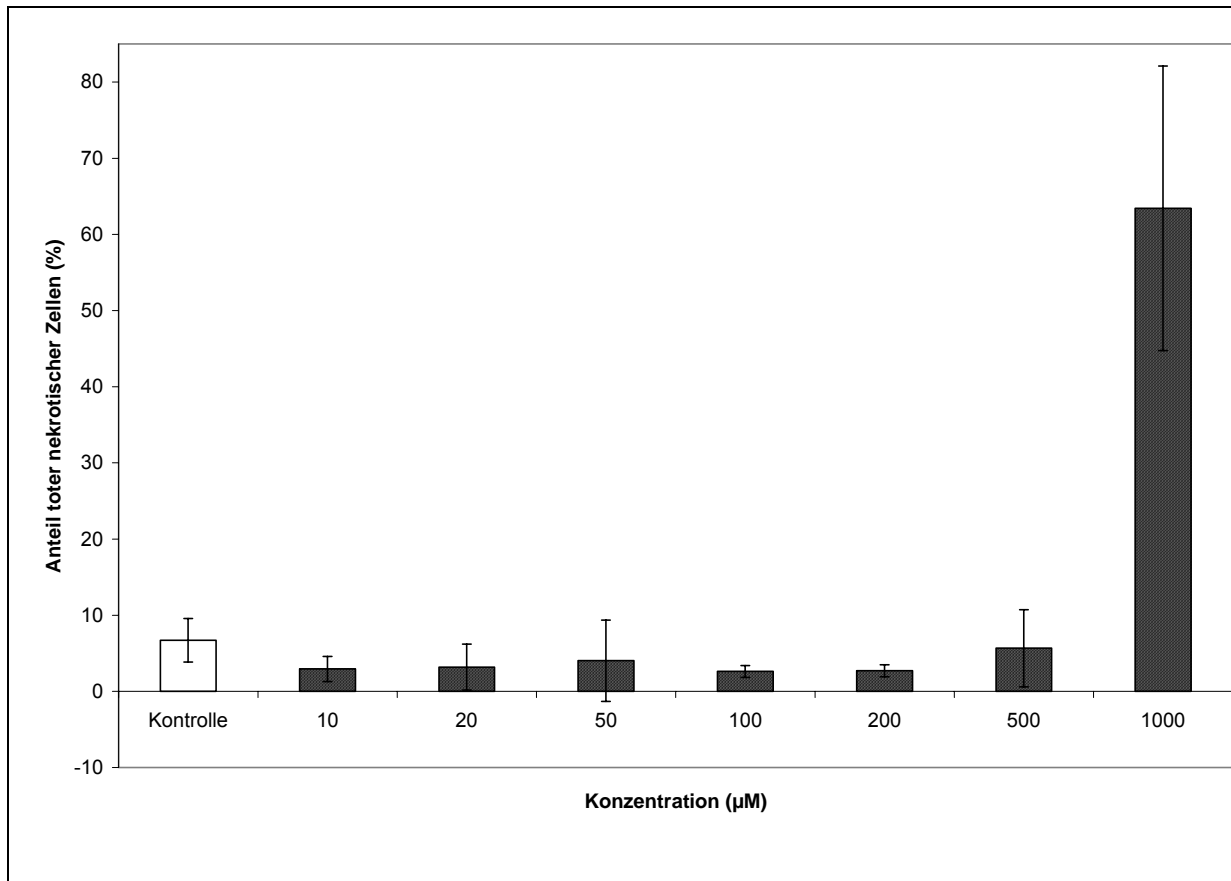


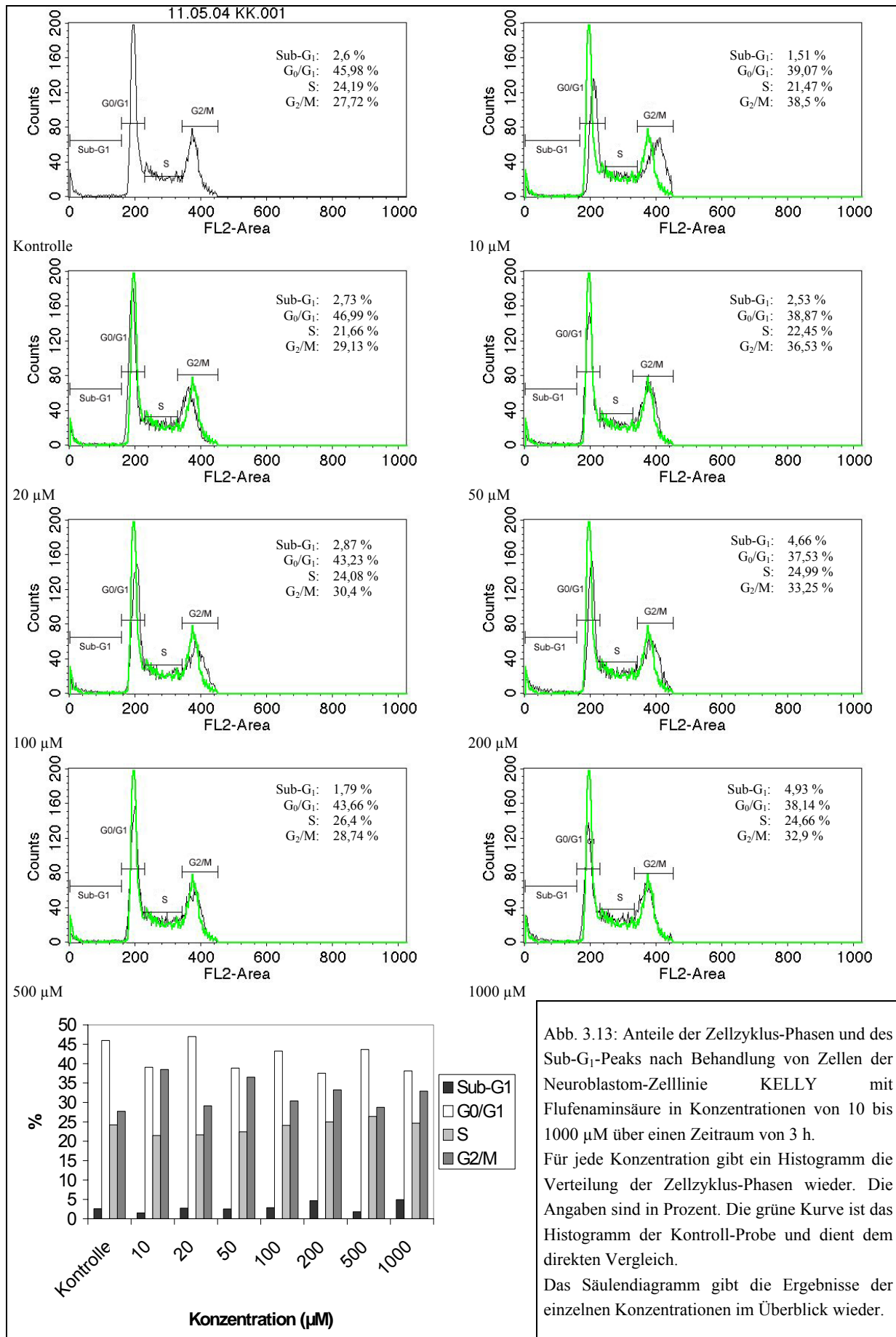
Abb. 3.12: Anteil totter nekrotischer (TN) Neuroblastomzellen nach einer Behandlungszeit von 24 h mit Flufenaminsäure in Konzentrationen von 10 bis 1000 µM.

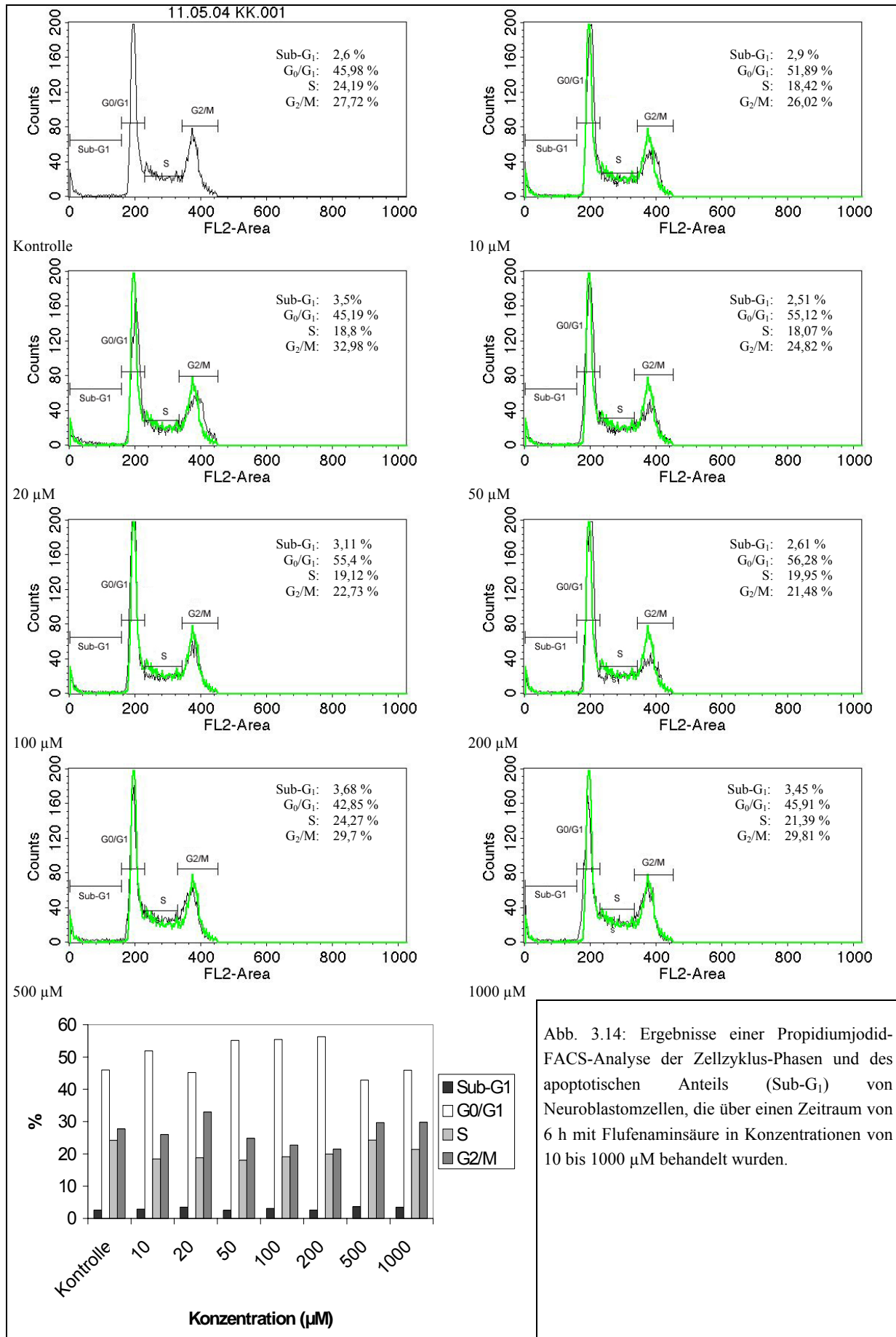
Die Anteile der toten nekrotischen Neuroblastomzellen lagen für Flufenaminsäure-Konzentrationen bis 500 µM relativ gleichmäßig bei deutlich unter 10 %, während ihr Anteil bei 1000 µM über 60 % stieg (Abb. 3.12). Das legt die Vermutung nahe, dass Flufenaminsäure bis zu einer Konzentration von 500 µM bei den Zellen der Neuroblastom-Zelllinie KELLY hauptsächlich apoptotische Prozesse initiiert.

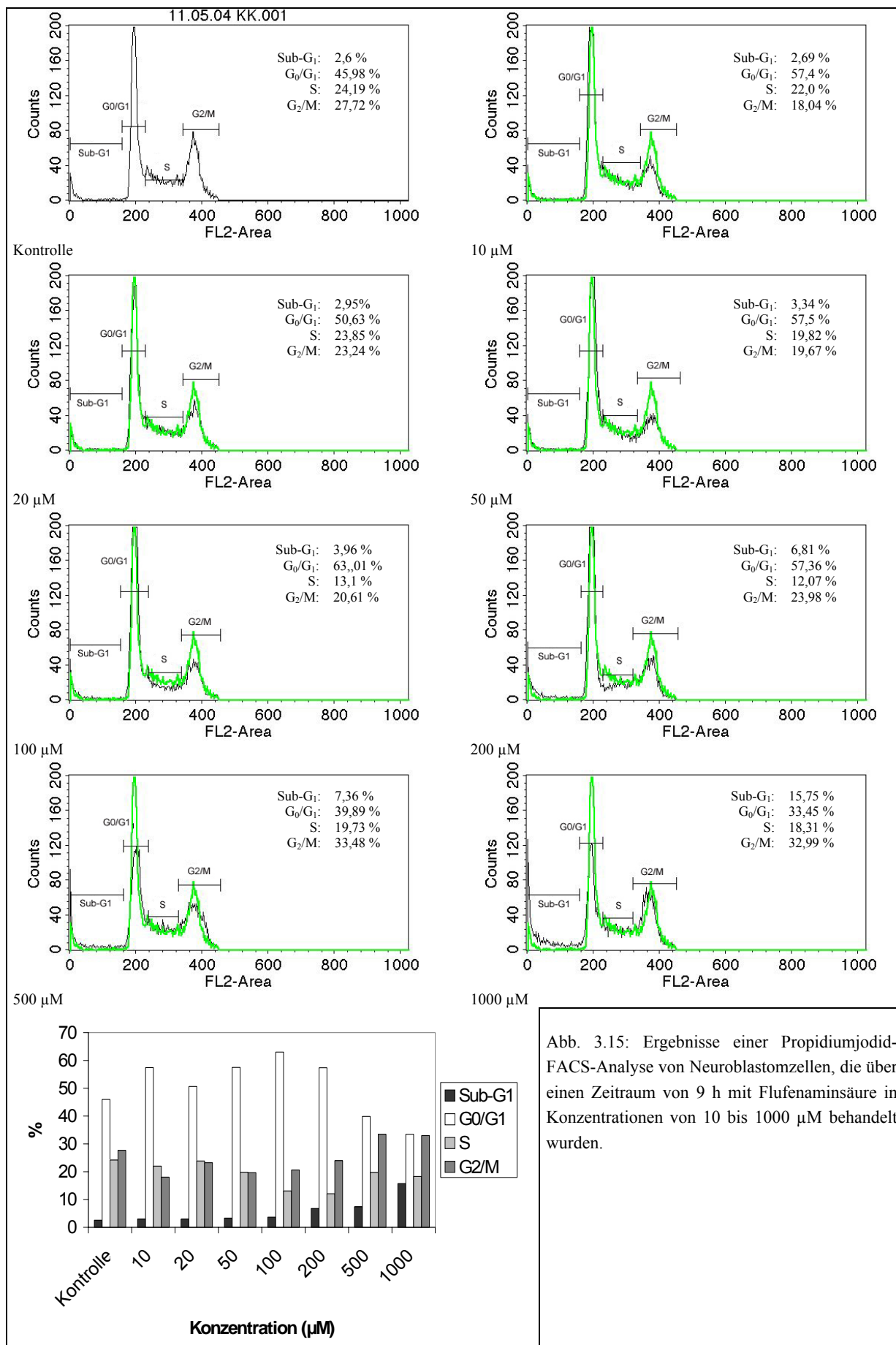
3.3.2. *FACS-Analyse des DNA-Gehalts mit Propidiumjodid*

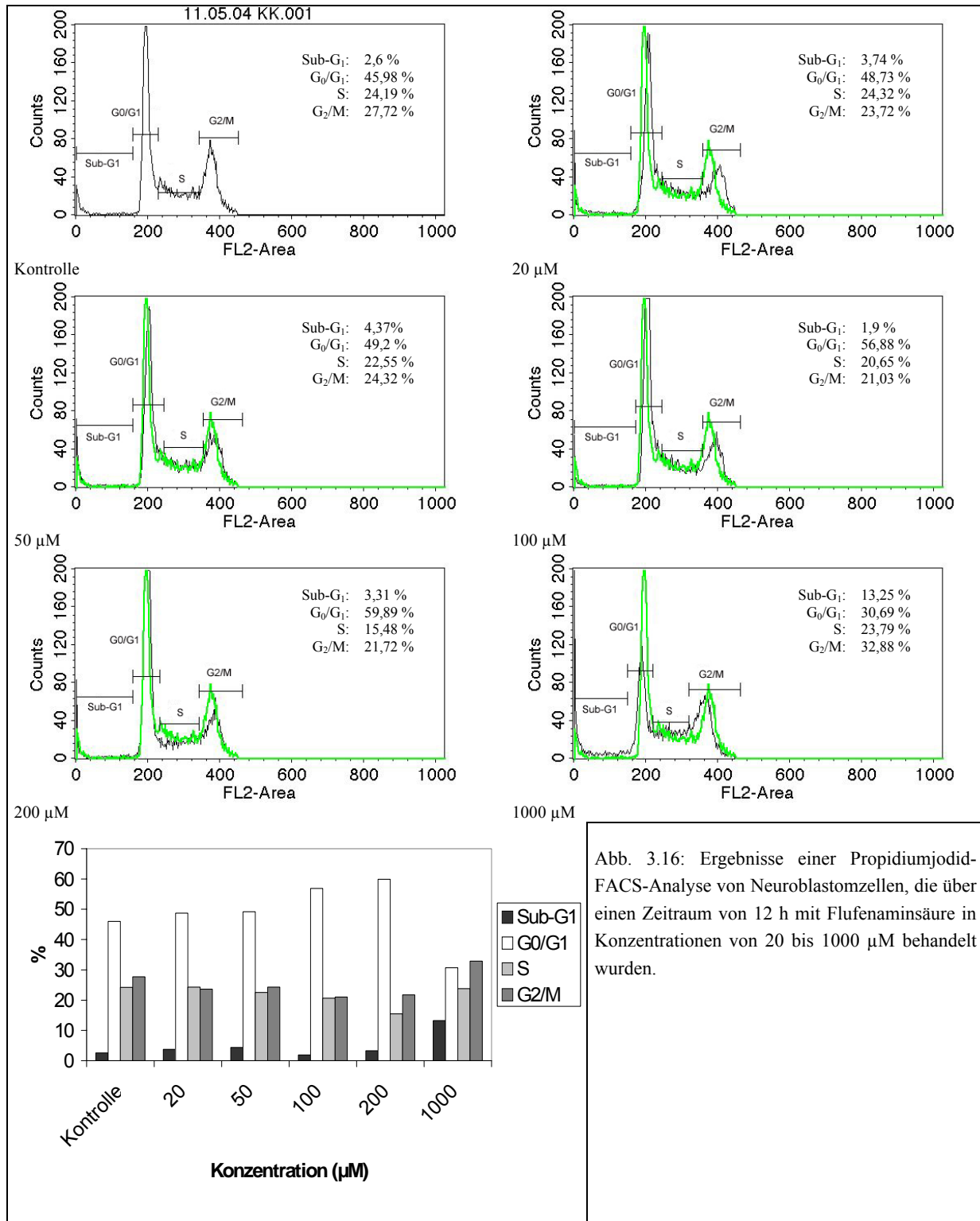
Werden fixierte Zellen mit Propidiumjodid (PI) behandelt, so kann dieser Fluoreszenzfarbstoff in die Zellen gelangen und sich dort stöchiometrisch in die DNA einlagern, so dass es zu einer Fluoreszenz kommt, die proportional zum DNA-Gehalt der Zelle ist. Am DNA-Gehalt können so die einzelnen Zellzyklus-Phasen, G₀/G₁-, S- und G₂/M-Phase, unterschieden werden. Darüber hinaus tauchen apoptotische Zellen in einem sogenannten Sub-G₁-Peak auf, weil im Verlauf der Apoptose degradierte DNA durch die durch Fixierung permeabel gewordenen Zellmembranen ausgewaschen wird.

So wurde mithilfe einer FACS-Analyse mit Propidiumjodid der Einfluss von Flufenaminsäure in Konzentrationen von 10 bis 1000 µM auf die Zellzyklus-Phasen und auf den Anteil apoptotischer Zellen in Abhängigkeit der Behandlungszeit untersucht (Abb. 3.13 – 3.16).









Zellen der Neuroblastom-Zelllinie KELLY wurden über 3 h, 6 h, 9 h und 12 h mit Flufenaminsäure behandelt. Nach 3-stündiger Behandlungszeit war bezüglich der Zellzyklus-Phasen und des Anteils apoptotischer Zellen in Abhängigkeit der Flufenaminsäure-Konzentration kein eindeutiger Trend erkennbar. Was jedoch deutlich wurde, war die relativ hohe Zellteilungsrate der Zelllinie, da sowohl bei der Kontroll-Probe, als auch bei den behandelten Zellen der Anteil der Zellen, die sich in der S- oder in der G₂/M-Phase befanden,

nach 3 h bei bzw. deutlich über 50 % lag (Abb. 3.13). Bei längeren Behandlungszeiten von 6 h, 9 h und 12 h änderten sich die Anteile der Zellen in der G_0/G_1 -Phase und in der G_2/M -Phase gegenläufig. So sank bis zur Konzentration von 200 μM der Anteil der Zellen, die sich in der G_2/M -Phase befanden, deutlich unter 25 % (Abb. 3.14 – 3.16 und 3.18). Bei der Betrachtung des Anteils der Zellen, die sich in der G_0/G_1 -Phase befanden, stellte sich ein umgekehrtes Verhältnis dar. Während sich über einen Behandlungszeitraum von 3 h keine nennenswerten Veränderungen des Anteils der Zellen in der G_0/G_1 -Phase, der im Durchschnitt bei knapp über 40 % lag, ergab (Abb. 3.13 und 3.17), befanden sich von den Neuroblastomzellen bei Behandlungszeiten von 6 h bis 12 h für Flufenaminsäure-Konzentrationen bis 200 μM bis zum Teil über 60 % in der G_0/G_1 -Phase (Abb. 3.14 – 3.16 und 3.17).

Auffälligerweise kehrte sich das Verhältnis bei Konzentrationen über 200 μM Flufenaminsäure um. Dabei ging bei 6 h bis 12 h Behandlungszeit der Anteil der Zellen, die sich in der G_0/G_1 -Phase befanden, mit steigender Konzentration zum Teil auf eine Größenordnung unter dem Ausgangsniveau zurück, während der Anteil der Zellen, die sich in der G_2/M -Phase befanden, teilweise von weit unter 20 % auf deutlich über 30 % anstieg (Abb. 3.14 – 3.18).

Der Anteil der apoptotischen Zellen, die im sogenannten Sub- G_1 -Peak auftauchen, blieb bei Behandlungszeiten von 3 h und 6 h auf ähnlichem Niveau (Abb. 3.13, 3.14 und 3.19). Dagegen war nach 9 h und 12 h ab einer Konzentration von 200 μM ein eindeutiger Anstieg des Anteils der Neuroblastomzellen, die als Sub- G_1 -Peak erschienen und daher als apoptotische Zellen gewertet wurden, auszumachen (Abb. 3.15, 3.16 und 3.19).

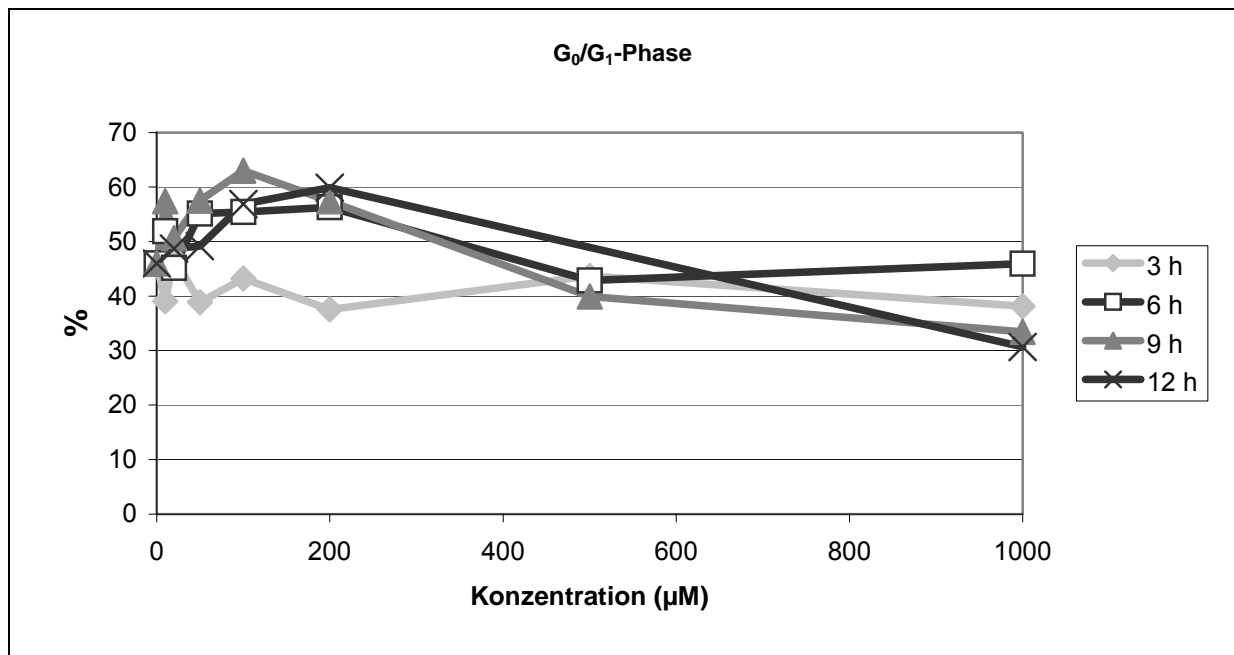


Abb. 3.17: Anteile der Neuroblastomzellen, die sich nach Behandlung mit Flufenaminsäure in Konzentrationen von 10 bis 1000 μM über 3 h, 6 h, 9 h und 12 h in der G_0/G_1 -Phase befanden.

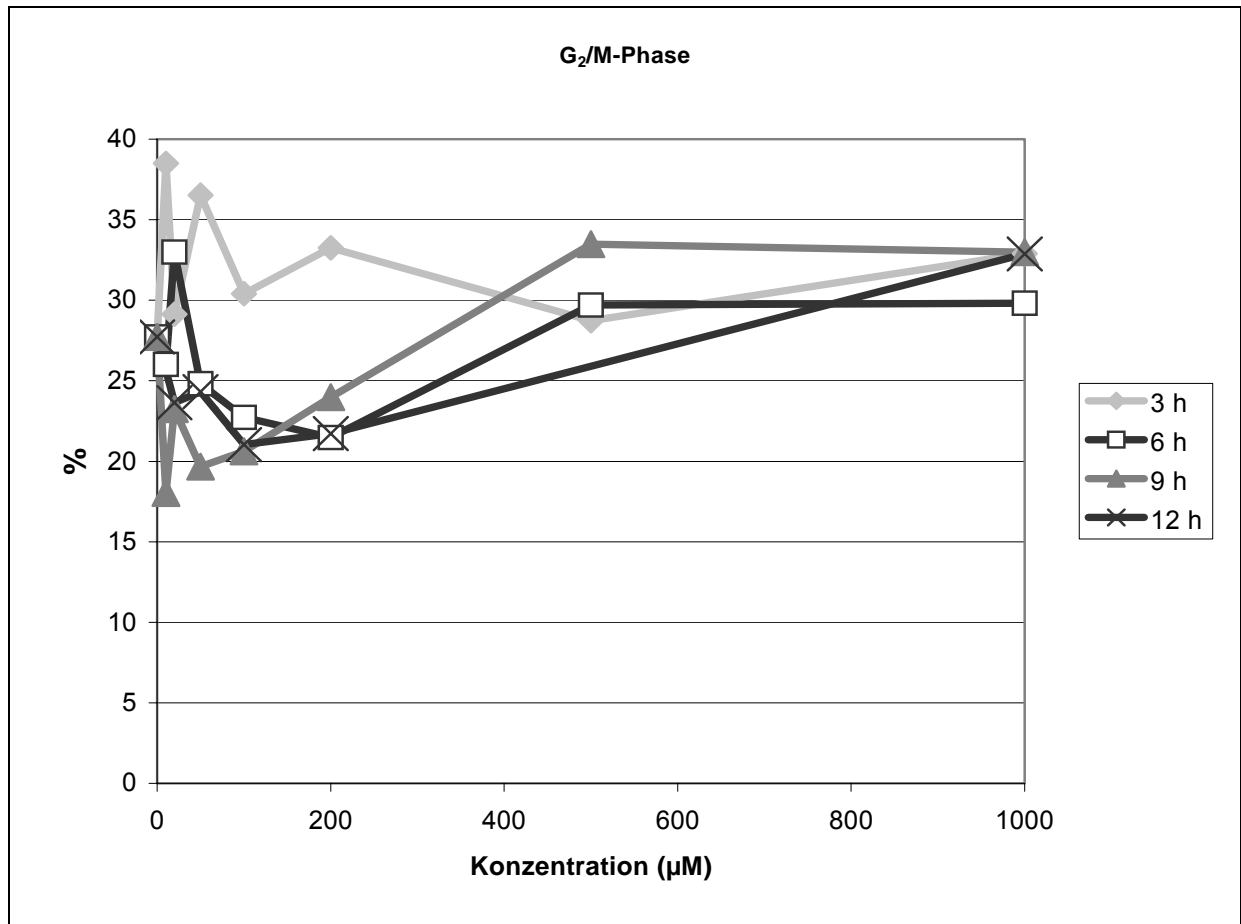


Abb. 3.18: Anteile der Neuroblastomzellen, die sich nach Behandlung mit Flufenaminsäure in Konzentrationen von 10 bis 1000 µM über 3 h, 6 h, 9 h und 12 h in der Zellzyklusphase G₂/M befanden.

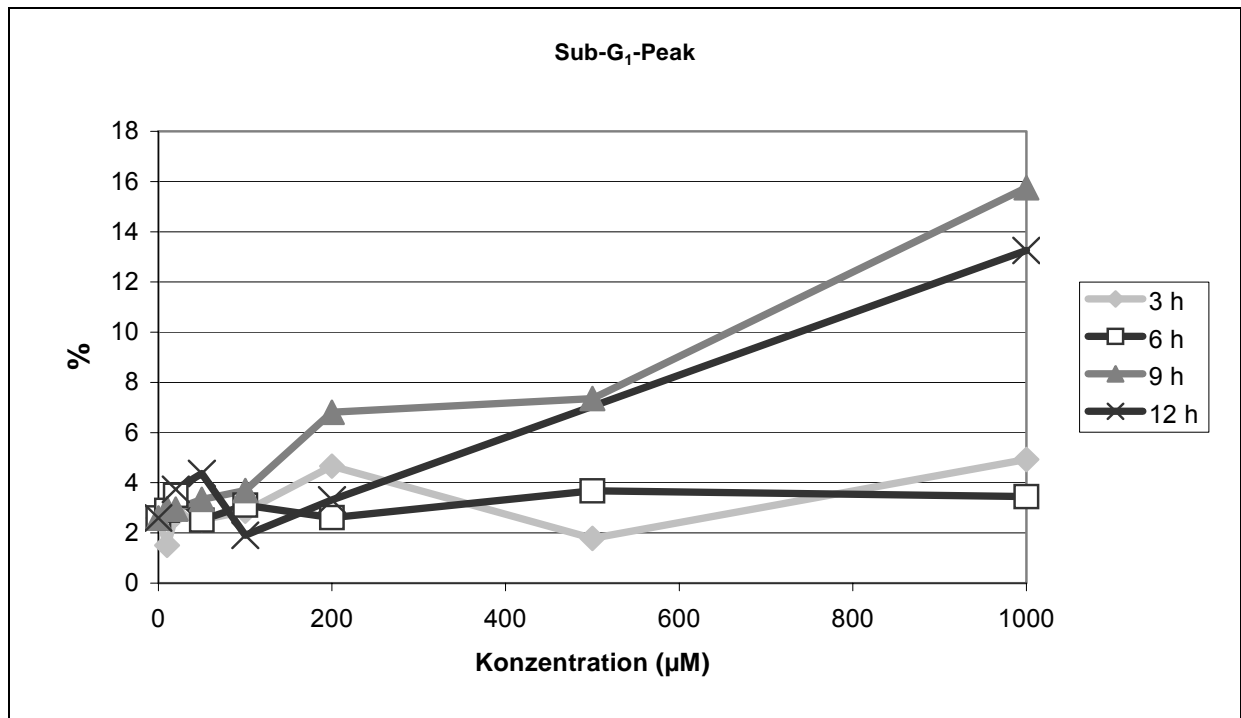


Abb. 3.19: Anteile der Neuroblastomzellen, die nach Behandlung mit Flufenaminsäure in Konzentrationen von 10 bis 1000 µM über 3 h, 6 h, 9 h und 12 h im Sub-G₁-Peak auftauchten.

Bei einem Vergleich der Ergebnisse der Acridinorange/Ethidiumbromid-Färbung (AO/EB-Färbung) mit der Propidiumjodid-FACS-Analyse geht der Trend bezüglich der apoptotischen Zellen zwar in die gleiche Richtung, jedoch sind die absoluten prozentualen Werte nicht zu vergleichen, da zum einen die Versuche mit unterschiedlichen Behandlungszeiten (24 h vs. 3 – 12 h) durchgeführt wurden, und zum anderen die FACS-Analyse mit Propidiumjodid bezüglich der apoptotischen Zellen offensichtlich weniger empfindlich ist als die AO/EB-Färbung.

Jedoch lässt sich an dieser Stelle sagen, dass aufgrund der Ergebnisse der AO/EB-Färbung, der FACS-Analyse mit Propidiumjodid, der Vitalitätsmessung mit MTT und auch der Untersuchungen der Morphologie eine Konzentration von 500 μ M Flufenaminsäure als günstige Richtkonzentration für die folgenden Untersuchungen der Protein- und mRNA-Expression angesehen wurde. So zeigten die Ergebnisse der AO/EB-Färbung, dass bei 500 μ M Flufenaminsäure selbst nach 24-stündiger Behandlungszeit nur ein geringer und kaum von der Kontroll-Probe abweichender Anteil der Zellen den nekrotischen Zelltod gestorben war, der überwiegende Teil der Zellen jedoch im Prozess der Apoptose stand (Abb. 3.10 – 3.12). Zudem zeigt die Propidiumjodid-FACS-Analyse ab einer Konzentration von 200 μ M Flufenaminsäure und ab einer Behandlungszeit von 9 h einen deutlichen Anstieg apoptotischer Zellen (Abb. 3.19). Auch die Untersuchungen der Morphologie der Neuroblastomzellen unter dem Einfluss von Flufenaminsäure legen für die weiteren Versuche eine Konzentration von 500 μ M nahe, da es die höchste Konzentration war, bei der über einen Behandlungszeitraum von bis zu 24 h keine Veränderungen der Zellmorphologie lichtmikroskopisch erkennbar waren, jedoch die Proliferation mit der Zeit abzunehmen schien (Abb. 3.3 – 3.7). Die Ergebnisse des MTT-Tests wiesen zusätzlich darauf hin, dass nach einer Behandlungszeit von 12 h mit 500 μ M Flufenaminsäure die Aktivität mit ca. 70 % (Abb. 3.2) ausreichend groß war, um davon ausgehen zu können, dass bei dieser Konzentration und Behandlungszeit der größte Teil der Zellen noch lebt.

Aufgrund der durchgeführten Versuche wurde für die weiteren Untersuchungen der Protein- und mRNA-Expression der Zellen der Neuroblastom-Zelllinie KELLY angenommen, dass mit Flufenaminsäure in einer Konzentration von 500 μ M innerhalb von 12 h von einem Großteil der Zellen die Apoptose eingeleitet wird.

3.4. Untersuchungen der Transkription der Cyclooxygenasen

Um einerseits zu untersuchen, ob die mRNA der Cyclooxygenasen Cox-1 und Cox-2 in der Neuroblastom-Zelllinie KELLY exprimiert werden, und andererseits, ob die Behandlung der Zellen mit 500 μ M Flufenaminsäure über einen Zeitraum von 30 min bis 8 h auf deren Expression Einfluss hat, wurde mithilfe der RT-PCR die mRNA-Expression von Cox-1 und Cox-2 bestimmt.

Für Cox-1 war kein Ergebnis zu erzielen, obwohl mit dem eingesetzten Primer-Paar aus anderen Zellen unter den gewählten Bedingungen Cox-1-cDNA amplifiziert werden konnte. Es ist daher davon auszugehen, dass die Neuroblastom-Zelllinie KELLY keine Cox-1-mRNA exprimiert. Jedoch wird eindeutig Cox-2-mRNA exprimiert. Dabei ist auffällig, dass die mRNA-Expression von Cox-2 in Abhängigkeit der Behandlungszeit ansteigt (Abb. 3.20).

Die Ergebnisse waren für die Behandlungszeiten von 2 h, 4 h und 8 h statistisch signifikant.

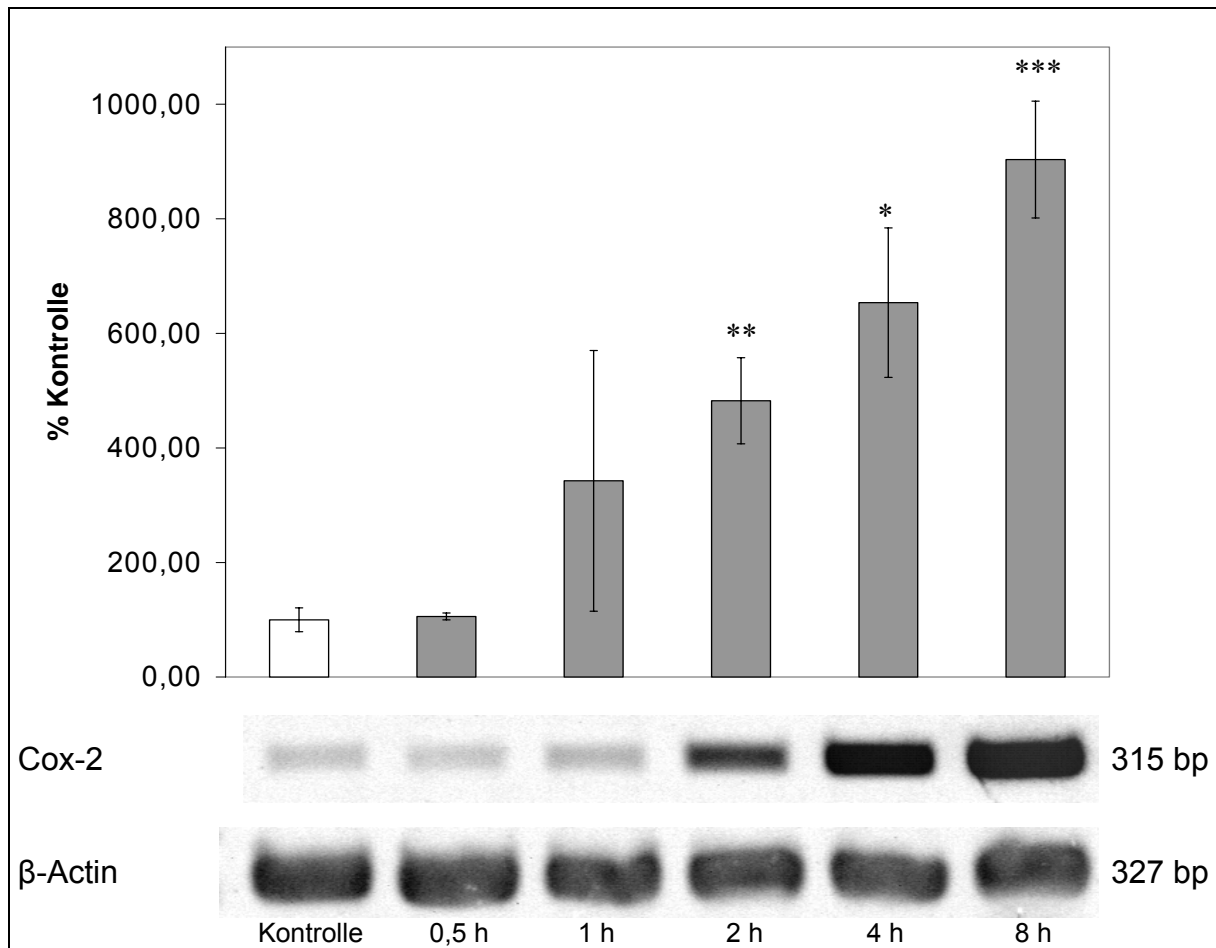


Abb. 3.20: Bestimmung der Expression der mRNA von Cox-2 mittels RT-PCR nach Behandlung der Neuroblastom-Zelllinie KELLY mit 500 μ M Flufenaminsäure über 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 8 h. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung der Banden. Dargestellt ist der Mittelwert des Cox-2-Signals \pm SD ($n = 3$) im Verhältnis zur β -Actin-Kontrolle. Dabei wurde der Mittelwert des Cox-2-Signals der unbehandelten Kontroll-Gruppe auf 100 % gesetzt. Für die Behandlungszeiten von 2 h, 4 h und 8 h waren die Unterschiede zur Kontroll-Gruppe statistisch signifikant (* : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$).

3.5. Hemmung der Prostanoid-Synthese unter Einfluss von Flufenaminsäure

Mithilfe eines mit einem Gaschromatographen gekoppelten Tripel-Quadrupol-Massenspektrometers wurden die Konzentrationen von verschiedenen Prostanoiden aus dem Zellüberstand der kultivierten Zellen der Neuroblastom-Zelllinie KELLY bestimmt. Dafür wurden die Zellen mit 500 μM Flufenaminsäure gegen Kontrolle behandelt und die Proben zu 5 verschiedenen Zeitpunkten entnommen: 0 h, 3 h, 6 h, 9 h und 12 h. Die Proben wurden sowohl für die Flufenaminsäure-Gruppe, als auch für die Kontroll-Gruppe von jeweils 3 Zellproben ($n = 3$) abgenommen. Es wurden die Konzentrationen der Prostanoid Prostaglandin (PG) E_2 , Thromboxan (Tx) B_2 und der F-Isoprostane bestimmt, deren Synthese durch die Behandlung mit Flufenaminsäure signifikant gehemmt wurde (Abb. 3.21 – 3.23).

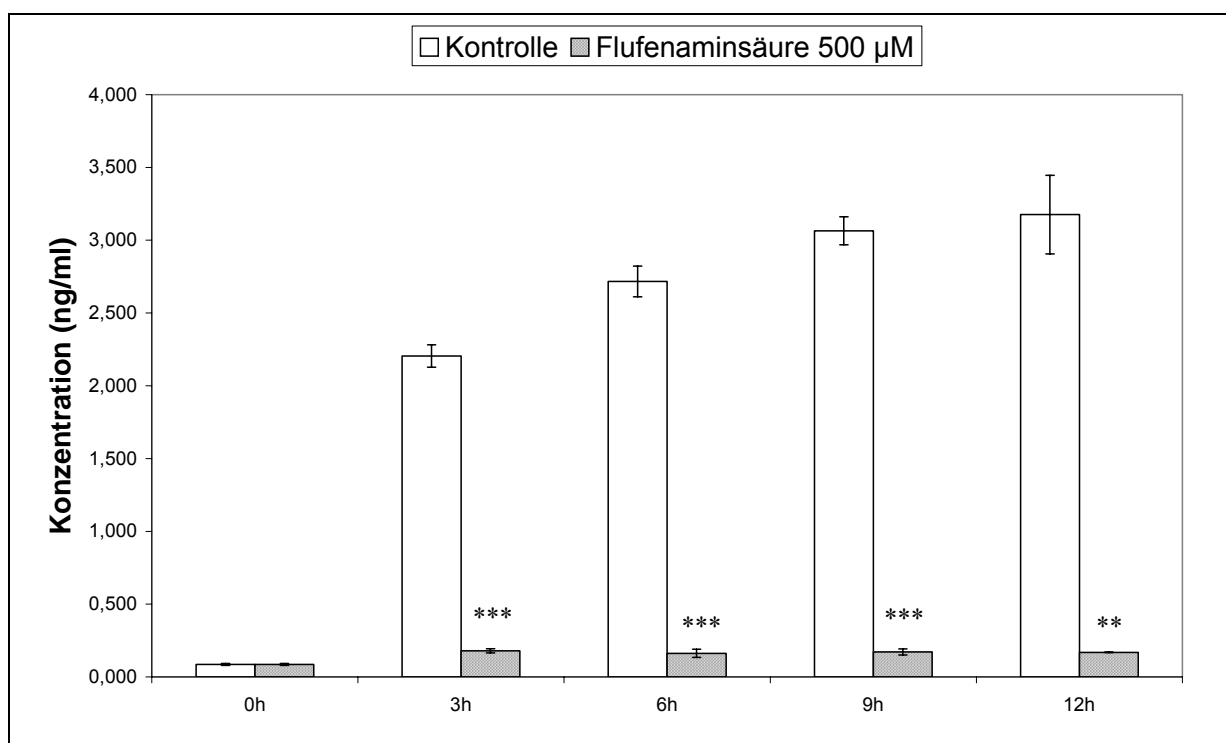


Abb. 3.21: Quantitative PGE_2 -Bestimmung aus den Zellüberständen von behandelten und unbehandelten Neuroblastomzellen mittels GC-MS/MS. Die PGE_2 -Konzentrationen in den Zellüberständen der mit Flufenaminsäure behandelten Zellen überstiegen im Verlauf der Behandlungszeit kaum das Ausgangsniveau, während in der Kontroll-Gruppe die PGE_2 -Konzentrationen nach einer Behandlungszeit von 12 h auf das ungefähr 37fache des Ausgangswertes anstiegen. Dargestellt sind die mittleren PGE_2 -Konzentrationen \pm SD. Die drei bzw. zwei Sterne bezeichnen statistisch signifikante Unterschiede der Flufenaminsäure-Gruppe zur Kontroll-Gruppe von $p \leq 0,001$ bzw. $p \leq 0,01$.

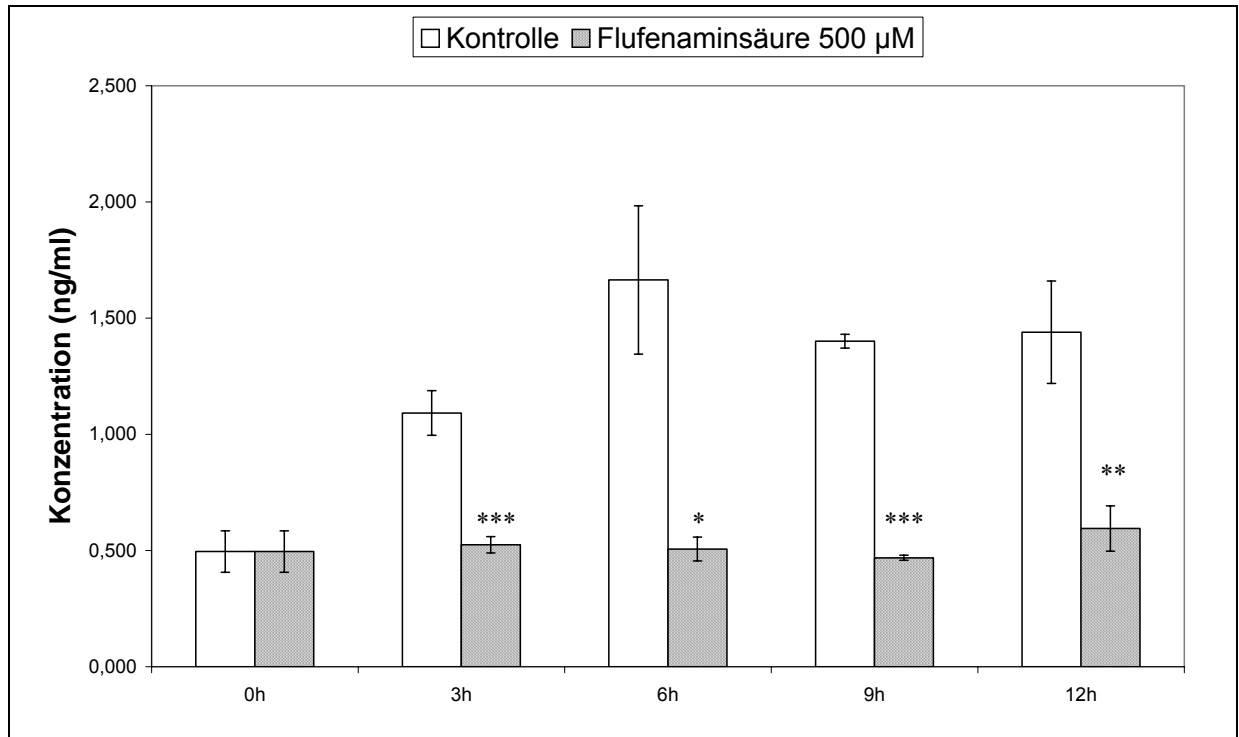


Abb. 3.22: Quantitative TxB_2 -Bestimmung aus den Zellüberständen von behandelten und unbehandelten Neuroblastomzellen mittels GC-MS/MS. Die TxB_2 -Konzentrationen in den Zellüberständen der mit Flufenaminsäure behandelten Zellen änderten sich im Verlauf der Behandlungszeit kaum, während in der Kontroll-Gruppe die TxB_2 -Konzentrationen im Zeitraum von 12 h deutlich anstiegen. Abgebildet sind die Mittelwerte \pm SD. Die Unterschiede der Flufenaminsäure-Gruppe zur Kontroll-Gruppe waren statistisch signifikant (* : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$).

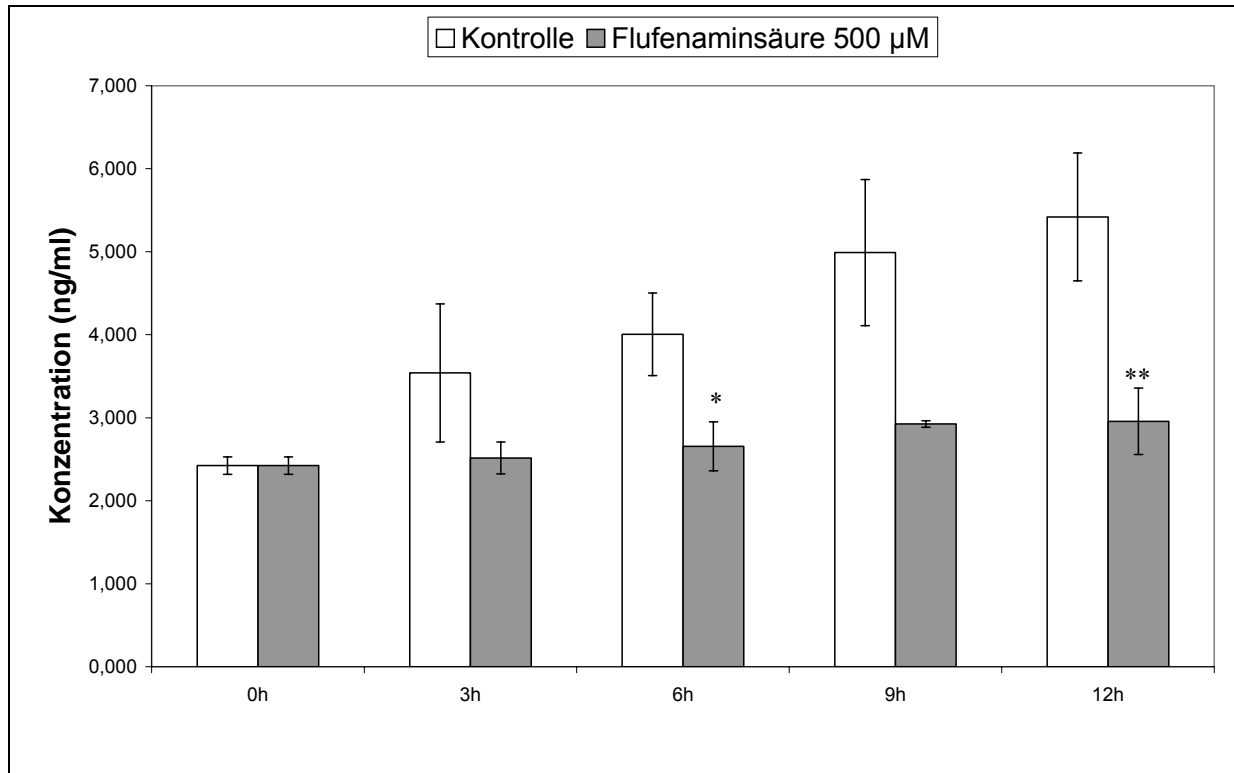


Abb. 3.23: Quantitative F₂-Isoprostan-Bestimmung aus den Zellüberständen von behandelten und unbehandelten Neuroblastomzellen mittels GC-MS/MS. Die Konzentrationen der F₂-Isoprostane in den Zellüberständen der mit Flufenaminsäure behandelten Zellen stiegen im Verlauf der Behandlungszeit nur leicht an, während in der Kontroll-Gruppe die F₂-Isoprostan-Konzentrationen über den Behandlungszeitraum von 12 h deutlich stärker zunahmen. Dargestellt sind die mittleren F₂-Isoprostan-Konzentrationen \pm SD. Die Ergebnisse waren nur zum Teil statistisch signifikant (* : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$).

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die eingesetzte Konzentration von Flufenaminsäure eine effektive Hemmung der Cyclooxygenasen bewirkt. Durch die nachgewiesene Synthese von PGE₂, TxB₂ und F₂-Isoprostanen liegt die Annahme nahe, dass die Neuroblastom-Zelllinie KELLY die PGE-, die Thromboxan- und die PGF- Synthase exprimiert.

3.6. Änderungen des Proteinmusters von Neuroblastomzellen nach Behandlung mit Flufenaminsäure

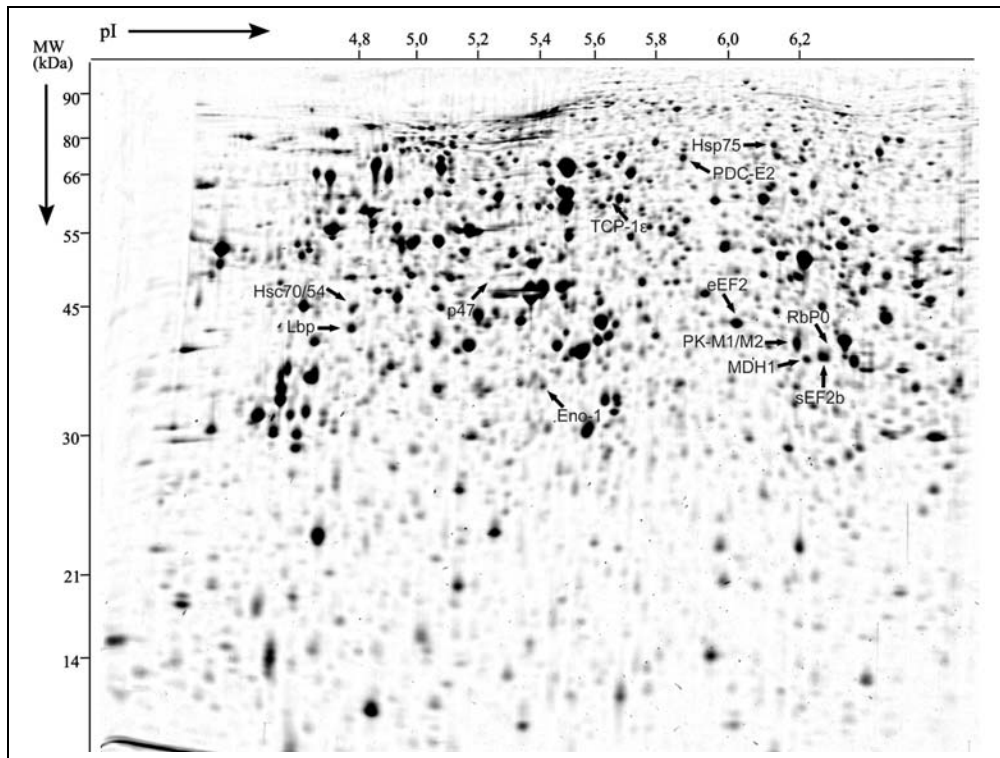
3.6.1. *Regulierte Proteine im Überblick*

Um Proteine zu identifizieren, die durch die Behandlung mit dem NSAR Flufenaminsäure die Apoptose und/oder Tumorgenese beeinflussen, wurde mit Zellen der Neuroblastom-Zelllinie KELLY eine differentielle Proteomanalyse durchgeführt. Dabei wurden die Proteinmuster der Kontrollzellen (n = 5) mit denen der Zellen (n = 10) verglichen, die über einen Zeitraum von 12 h mit 500 µM Flufenaminsäure behandelt wurden.

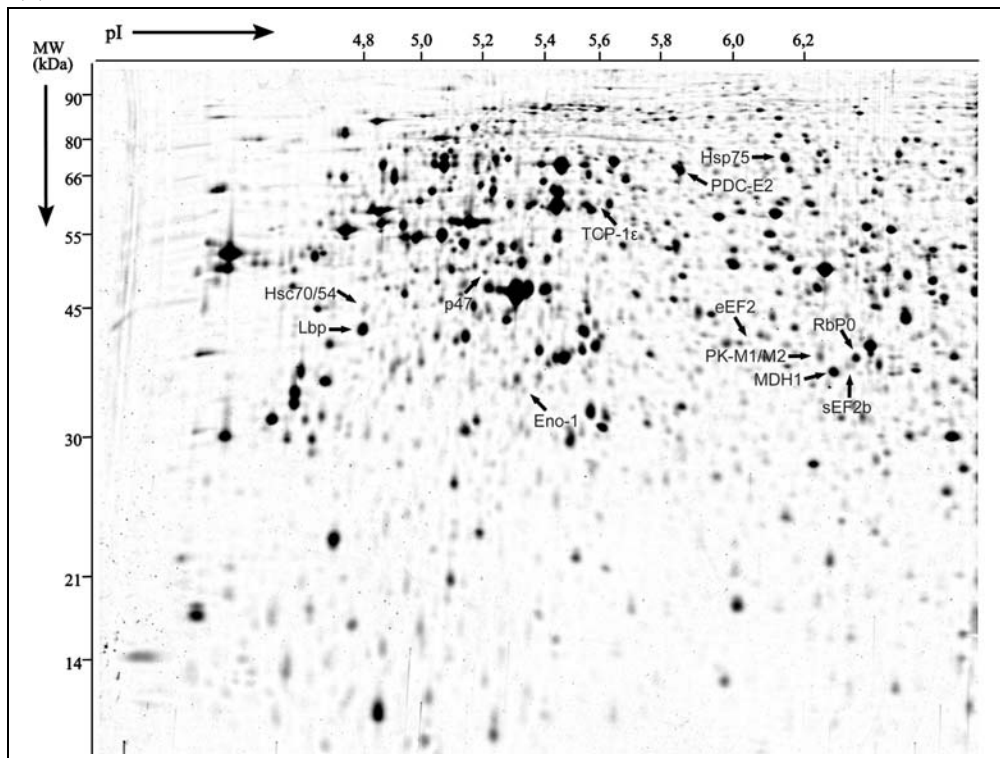
Mithilfe der zweidimensionalen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-SDS-PAGE) konnten auf jedem Gel ungefähr 1500 bis 2000 Proteine aufgetrennt und detektiert werden. Der pI-Bereich reichte dabei von pH 4 bis 7, während die Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine zwischen 10 und 100 kDa lagen.

Für den computergestützten Vergleich der Proteinmuster wurden die Proteine durch eine modifizierte Färbung mit Silbernitrat nach H. Blum detektiert (Blum H, et al., 1987), während für die Identifikation einzelner Proteine mittels MALDI-TOF in einigen Fällen eine Färbung mit kolloidalem Coomassie Brilliantblau G-250 nach V. Neuhoff durchgeführt wurde (Neuhoff V, et al., 1985; Neuhoff V, et al., 1988). Die im folgenden Teil der Arbeit dargestellten 2D-Gele wurden ausnahmslos mit Silbernitrat gefärbt.

Durch die Behandlung der Neuroblastomzellen mit Flufenaminsäure wurden parallel zur Induktion apoptotischer Prozesse mindestens zwölf der detektierten Proteine reproduzierbar und statistisch signifikant reguliert. So kam es in sechs Fällen zu einer deutlichen Zunahme der Intensität der Protein-Spots, während sechs weitere Proteine unter dem Einfluss von Flufenaminsäure herunter reguliert wurden (Abb. 3.24, Tab. 3.1 und 3.2).



(A) Kontrolle



(B) 500 μ M Flufenaminsäure 12 h

Abb. 3.24: 2D-Gele von Zellproben der Neuroblastom-Zelllinie KELLY, die über 12 h mit 500 μ M Flufenaminsäure (B), und solchen, die als Kontrolle (A) über denselben Zeitraum nur mit dem entsprechenden Volumen an Lösungsmittel behandelt wurden. Die Spots, die unter dem Einfluss von Flufenaminsäure reguliert wurden, sind mit einem Pfeil und der entsprechenden Kurzbezeichnung markiert.

Die regulierten Protein-Spots wurden aus dem Gel ausgeschnitten, mit Trypsin verdaut und mittels MALDI-TOF und Datenbank-Recherchen identifiziert (Tab. 3.1 und 3.2).

Protein Identität	Kurz-bez.	NCBI Nr.	Eigenschaft/ Funktion	MW/ pI (theoret.)	MW/ pI (tatsächl.)	Regulation
Heat shock protein 75 p47	Hsp75 p47	2865466 7706395	Molekulares Chaperon Co-Faktor von p97-vermittelter Membranfusion	74,0 kDa/ 6,1 40,6 kDa/ 5,0	73 kDa/ 6,15 49 kDa/ 5,2	Zunahme (auf 313,1 %) Zunahme (auf 270,8 %)
Laminin-bindendes Protein	Lbp	34234	Laminin-Rezeptor	31,8 kDa/ 4,8	42 kDa/ 4,8	Zunahme (auf 232,9 %)
Cytosolische Malat-Dehydrogenase	MDH1	5174539	Malat-dehydrogenase	36,4 kDa/ 7,1	37 kDa/ 6,3	Zunahme (auf 245,5 %)
Ribosomales Protein P0	RbP0	12654583	Translation, DNA-Reparatur	34,3 kDa/ 5,3	38 kDa/ 6,35	Zunahme (auf 373,9 %)
Dihydrolipoamid-Acetyltransferase, Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit E2	PDC-E2	66511	Lipoylacyl-transferase	65,8 kDa/ 5,8	68 kDa/ 5,85	Zunahme (auf 247,9 %)

Tab. 3.1: Identifizierte Proteine der Neuroblastom-Zelllinie KELLY, deren Expression unter dem Einfluss von 500 μ M Flufenaminsäure über 12 h statistisch signifikant zunahm. Die Regulation des jeweiligen Protein-Spots ist als mittlere prozentuale Intensität angegeben, bezogen auf die mittlere Intensität des entsprechenden Spots der unbehandelten Kontrolle, die jeweils auf 100 % gesetzt wurde.

Protein Identität	Kurz-bez.	NCBI Nr.	Eigenschaft/ Funktion	MW/ pI (theoret.)	MW/ pI (tatsächl.)	Regulation
Heat shock cognate protein 54; Heat shock cognate protein, 71-kDa Enolase-1 (alpha)	Hsc70/54 Eno-1	24234686 4503571	Molekulares Chaperon Phosphopyruvat-hydratase	53,5 kDa/ 5,6 47,2 kDa/ 7,2	45 kDa/ 4,8 37 kDa/ 5,35	Abnahme (auf 28,5 %) Abnahme (auf 19,8 %)
T-Complex protein 1, Epsilon Untereinheit Pyruvat-Kinase, Isoform M1 oder M2 Eukaryotischer Elongationsfaktor 2 Similar to Elongation factor 2b	TCP-1e PK-M1/M2 eEF2 sEF2b	1351211 478822 18590554 19353009	Subtyp des heteromeren molekularen Chaperons CCT Phosphoenol-pyruvatkinase Faktor der Translation und Elongation Faktor der Translation und Elongation	59,7 kDa/ 5,4 57,9 kDa/ 7,5 94,0 kDa/ 6,4 57,5 kDa/ 6,5	60 kDa/ 5,6 38 kDa/ 6,25 41 kDa/ 6,1 37 kDa/ 6,35	Abnahme (auf 25,6 %) Abnahme (auf 29,5 %) Abnahme (auf 3,5 %) Abnahme (auf 11,6 %)

Tab. 3.2: Identifizierte Proteine der Neuroblastom-Zelllinie KELLY, deren Expression unter dem Einfluss von 500 μ M Flufenaminsäure über 12 h statistisch signifikant abnahm. Angegeben ist die mittlere prozentuale Intensität des jeweiligen Protein-Spots bezogen auf die mittlere Intensität des entsprechenden Spots der unbehandelten Kontrolle, die jeweils auf 100 % gesetzt wurde.

Nachfolgend sollen die Ergebnisse der differentiellen Proteomanalyse noch einmal detailliert für die einzelnen Proteine beschrieben werden. Hinzu kommen Ergebnisse aus Proteomanalysen, durch die Veränderungen der Protein-Spots unter dem Einfluss von 500 μ M Flufenaminsäure in Abhängigkeit der Zeit untersucht werden sollten. Dabei wurden die Intensitäten der detektierten Proteine zusätzlich nach Behandlungszeiten von 3 h, 6 h und 9 h analysiert, um Aussagen darüber treffen zu können, wann die nach 12 h deutlich zu beobachtenden Effekte eintraten. Die Ergebnisse beruhen dabei für jede Behandlungszeit auf jeweils zwei unabhängigen Versuchen (n = 2).

Außerdem werden Ergebnisse aus Western-Blot- und RT-PCR-Untersuchungen zu den jeweiligen Proteinen beschrieben.

3.6.2. Bei der differentiellen Proteomanalyse hoch regulierte Proteine

3.6.2.1. Heat shock protein 75 (Hsp75)

Die Behandlung von Zellen der Neuroblastom-Zelllinie KELLY mit 500 μ M Flufenaminsäure über 12 h bewirkte bei der Proteomanalyse im Vergleich zur Kontrolle eine deutliche und statistisch signifikante Zunahme der Intensität des Hsp75-Spots auf über 300 % ($p \leq 0,001$). Auch Untersuchungen der Hsp75-Expression über kürzere Behandlungszeiten von 3 h, 6 h und 9 h ergaben statistisch signifikante Veränderungen. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.25 zusammengefasst.

Es zeigte sich, dass die Intensität des Hsp75-Spots schon nach 3 h auf das ca. 2 ½-fache angestiegen war, was darauf hindeutet, dass dieses Protein unter dem Einfluss von Flufenaminsäure schon sehr früh reguliert wird (Abb. 3.25)

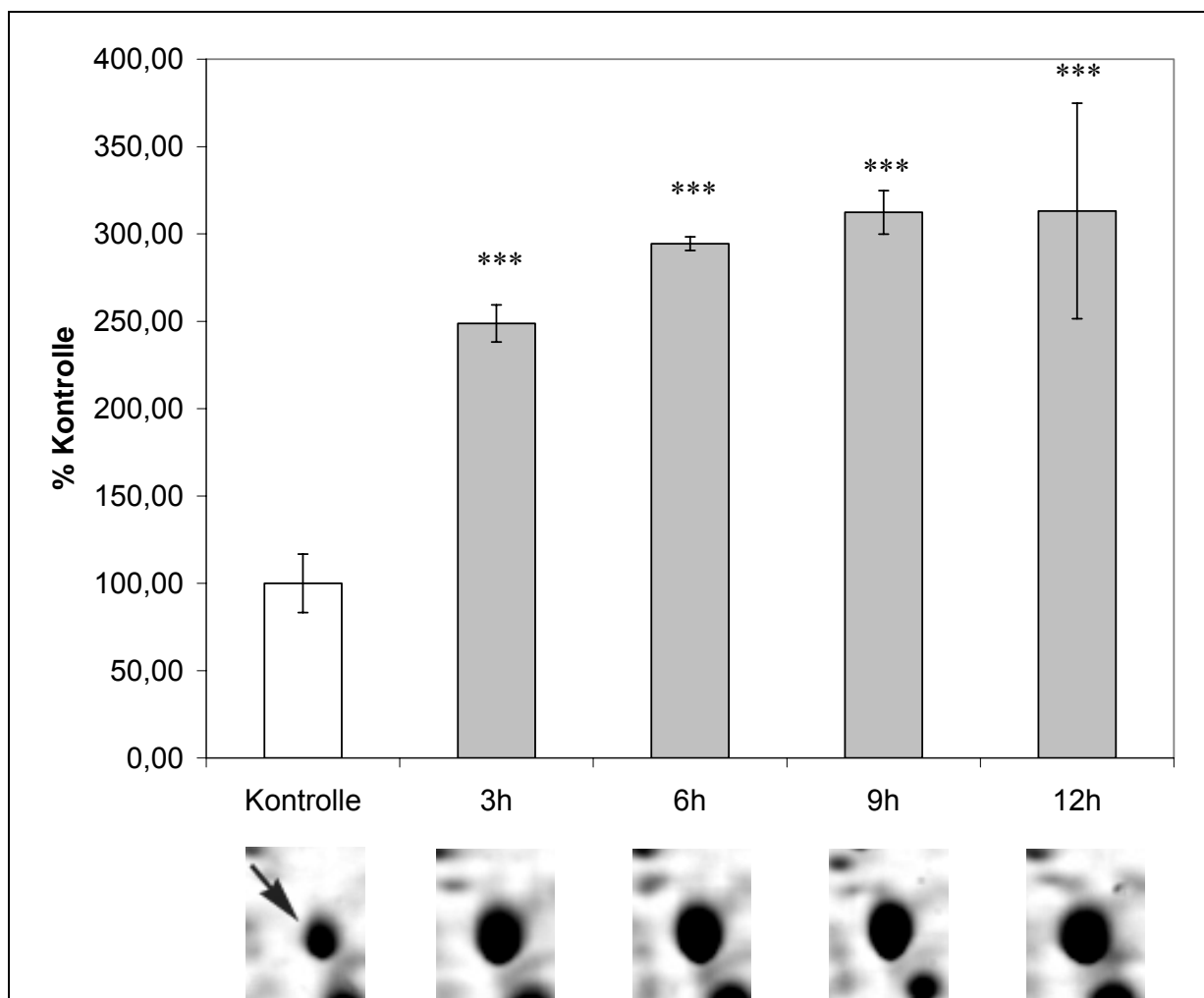


Abb. 3.25: Entwicklung der mittleren Intensität des durch 2D-SDS-PAGE aufgetrennten Protein-Spots von Hsp75 nach Behandlung von Neuroblastomzellen mit 500 μ M Flufenaminsäure über 3 h, 6 h, 9 h und 12 h. Das Säulendiagramm gibt die densitometrische Auswertung der mit Silber gefärbten Spots in Prozent \pm SD an, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. Die Sterne bezeichnen statistisch signifikante Unterschiede zur Kontroll-Gruppe von $p \leq 0,001$.

Aus der Literatur ist bekannt, dass das Heat shock protein 75, das als ein neues Mitglied der Hsp90-Familie molekularer Chaperone identifiziert wurde (Chen CF, et al., 1996), mit dem auch im Zusammenhang mit Apoptose und Zytotoxizität beschriebenen „Tumor necrosis factor receptor-associated protein 1“ (TRAP1) identisch ist (Song, HY, et al., 1995; Felts SJ, et al., 2000). Daher wurden Western-Blot-Analysen mit einem monoklonalen Antikörper gegen TRAP1 zur immunochemischen Detektion durchgeführt.

So wurden Proteinextrakte von Neuroblastomzellen, die über 12 h mit 500 μ M Flufenaminsäure bzw. als Kontrolle nur mit dem entsprechenden Lösungsmittel behandelt wurden, durch eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (1D-SDS-PAGE) aufgetrennt und ein Western-Blot mit immunochemischer Detektion mit dem TRAP1-Antikörper angeschlossen. Dabei wurde das Ergebnis der Proteomanalyse für Hsp75 bzw. TRAP1 zwar nicht in den absoluten Werten, was bei den unterschiedlichen Detektionsmethoden auch nicht zu erwarten war, aber sehr deutlich in der Tendenz bestätigt (Abb. 3.26).

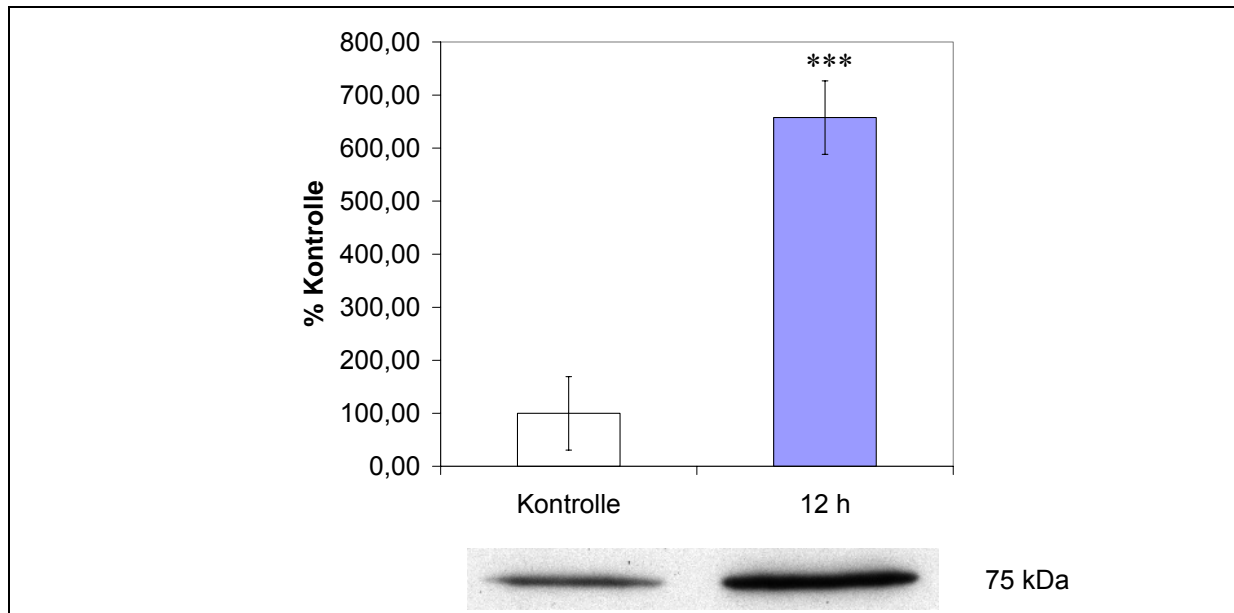


Abb. 3.26: Western-Blot von Hsp75/TRAP1 mit Neuroblastomzellen nach 12-stündiger Behandlung mit 500 μ M Flufenaminsäure. Dargestellt ist die mittlere Intensität des Hsp75/TRAP1-Signals \pm SD ($n = 3$). Dabei wurde die mittlere Intensität der Kontrolle auf 100 % gesetzt. Die drei Sterne markieren einen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrolle ($p \leq 0,001$).

Western-Blot-Analysen mit Gelen, in denen die Proteine der Neuroblastom-Zelllinie KELLY nach 12-stündiger Behandlung mit 500 μ M Flufenaminsäure mithilfe der zweidimensionalen SDS-PAGE aufgetrennt wurden, bestätigten sowohl die Lage von TRAP1/Hsp75 im zweidimensionalen Muster der Gele, als auch die Änderung der Intensität verglichen mit der Kontrolle (Abb. 3.27).

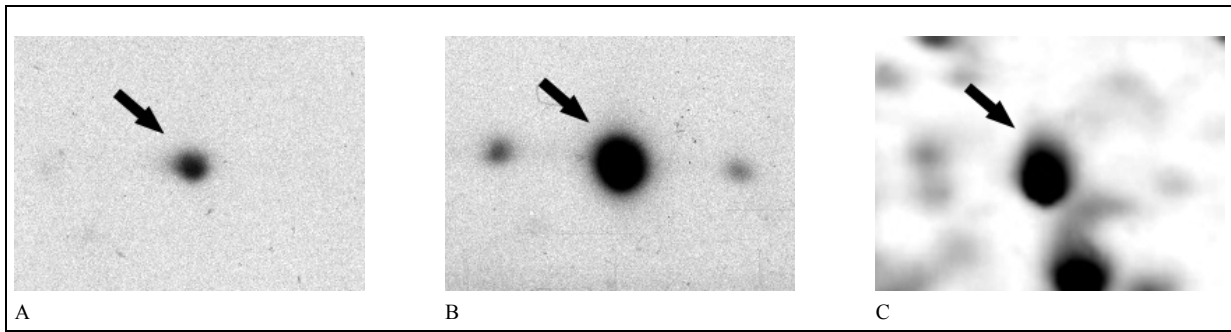


Abb. 3.27: Western-Blot mit 2D-Gelen von TRAP1/Hsp75 aus Zellen der Neuroblastom-Zelllinie KELLY, die über 12 h mit 500 μ M Flufenaminsäure (B) und als Kontrolle nur mit dem entsprechenden Lösungsmittel (A) behandelt wurden. Die Position des immunochemisch detektierten Protein-Spots stimmt exakt mit der Position des TRAP1/Hsp75-Spots (MW 73 kDa / pI 6,15) im Silber-gefärbten 2D-Gel (C) überein.

Bei diesen 2D-Western-Blot-Analysen traten bei den Proben, die mit Flufenaminsäure behandelt wurden, zwei weitere Protein-Spots deutlich hervor, die mit dem TRAP1-Antikörper reagierten (Abb. 3.27 B). Die Positionen dieser Spots stimmen mit zwei Protein-Spots im Silber-gefärbten 2D-Gel überein, die bei der differentiellen Proteomanalyse jedoch nicht als statistisch signifikant verändert analysiert wurden, was mit den unterschiedlichen Empfindlichkeiten der Detektionsmethoden zusammenhängen kann.

Bei einem weiteren 2D-Western-Blot konnte gezeigt werden, dass noch mehr Protein-Spots in der direkten Umgebung des als Hsp75 identifizierten Spots mit dem monoklonalen TRAP1-Antikörper reagierten (Abb. 3.28). Der Großteil dieser Spots konnte in den Silber-gefärbten 2D-Gelen nicht detektiert werden, da das Detektionsverfahren für so geringe Intensitäten nicht sensitiv genug war. Insgesamt reagierten mit dem TRAP1-Antikörper zwölf Protein-Spots, von denen allerdings nur die drei Spots mit der höchsten Intensität auch in den 2D-Gelen der differentiellen Proteomanalyse detektiert werden konnten. Von diesen drei Protein-Spots war allerdings nur der als Hsp75 identifizierte Spot für das gewählte Detektionsverfahren mit Silber intensiv genug, um eine Änderung der Intensität sicher analysieren zu können. Ob sich die Intensitäten der übrigen Spots, die mit dem TRAP1-Antikörper reagierten, unter dem Einfluss von Flufenaminsäure verändern, bleibt zu untersuchen.

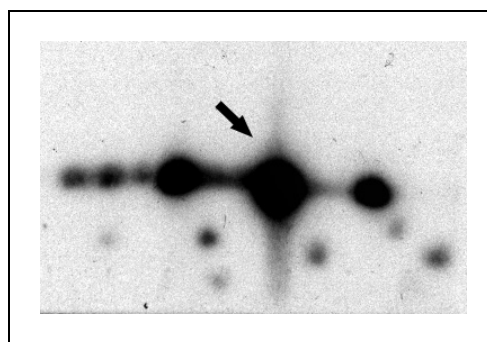


Abb. 3.28: Zweidimensionaler Western-Blot mit TRAP1-Antikörper zeigt um den als Hsp75/TRAP1 identifizierten Protein-Spot elf weitere Spots, die mit dem TRAP1-Antikörper reagierten.

Um zu untersuchen, ob die durch Flufenaminsäure hervorgerufene Zunahme des Hsp75-Proteingehalts auf eine vermehrte Hsp75-Transkription zurückzuführen ist, wurde in drei unabhängigen Versuchen ($n = 3$) die Expression der Hsp75-mRNA mittels RT-PCR untersucht. Die gesamte mRNA wurde aus Zellen der Neuroblastom-Zelllinie KELLY extrahiert, die mit 500 μ M Flufenaminsäure über 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 8 h behandelt worden waren. Die kürzeste Behandlungszeit war mit 30 min deutlich kürzer gewählt, als bei der differentiellen Proteomanalyse, um auch eine frühe Veränderung der mRNA-Expression erfassen zu können. Es zeigte sich, dass die Hsp75-mRNA-Expression bereits nach 30 min um das knapp 1½-fache gegenüber der Kontrolle erhöht war. Nach 1 h und 2 h war jedoch nur eine leichte, nicht signifikante Erhöhung der mRNA-Konzentration zu beobachten, während nach 4 h und 8 h die Hsp75-mRNA-Expression wieder anstieg (Abb. 3. 29).

Die auf Proteinebene beobachteten Veränderungen von TRAP1/Hsp75 können mindestens zu einem Teil mit einer vermehrten Transkription erklärt werden.

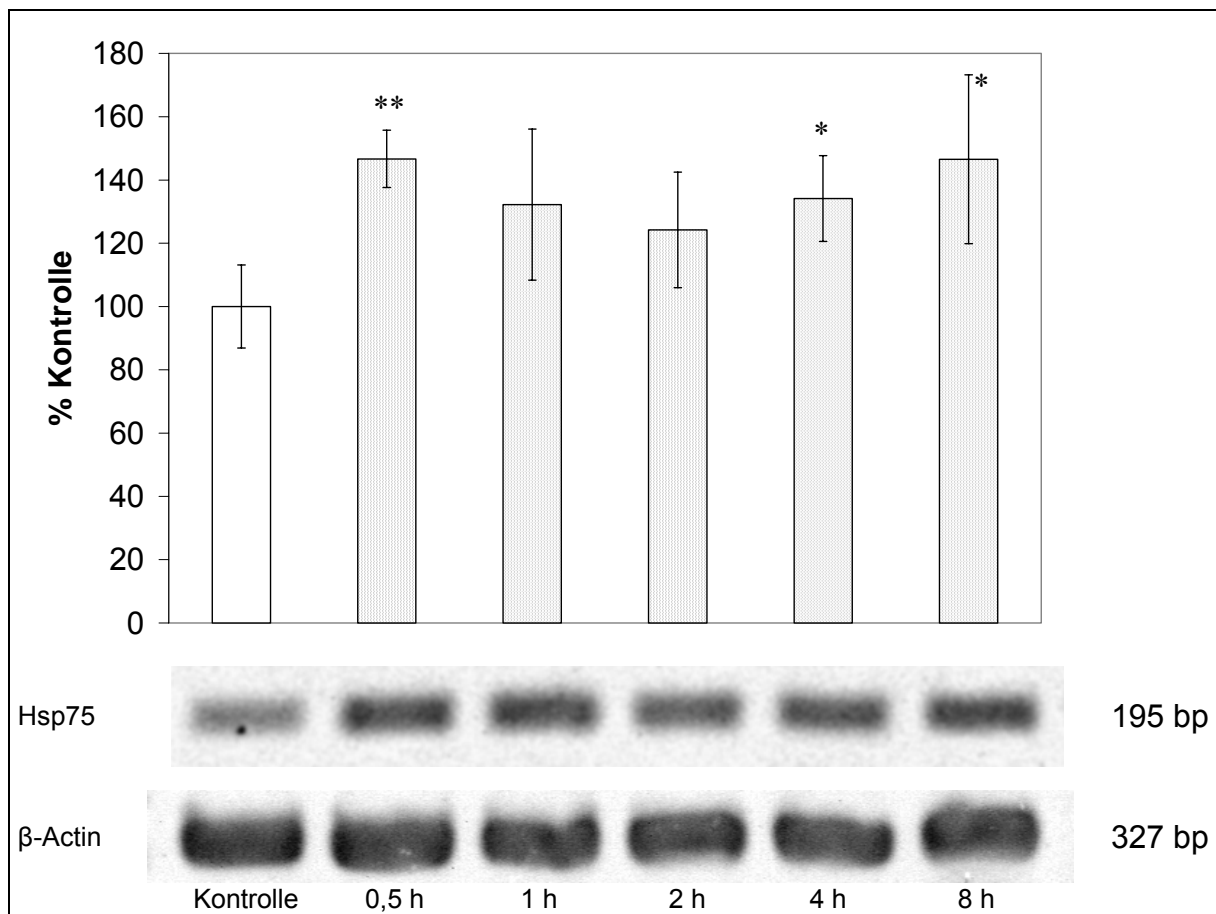


Abb. 3.29: Bestimmung der Expression der mRNA von TRAP1/Hsp75 mittels RT-PCR nach Behandlung von Zellen der Neuroblastom-Zelllinie KELLY mit 500 μ M Flufenaminsäure über 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 8 h ($n = 3$). Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung der Banden. Dargestellt ist der Mittelwert des TRAP1/Hsp75-Signals \pm SD im Verhältnis zur β -Actin-Kontrolle. Dabei wurde der Mittelwert der Intensität des TRAP1/Hsp75-Signals der unbehandelten Kontroll-Gruppe auf 100 % gesetzt. Für die Behandlungszeiten von 30 min, 4 h und 8 h waren die Unterschiede zur Kontroll-Gruppe statistisch signifikant (* : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$).

3.6.2.2. p47 (Co-Faktor von p97)

Die Behandlung der Neuroblastomzellen mit Flufenaminsäure in der beschriebenen Konzentration ergab nach 12 h auch eine deutliche Veränderung der Intensität eines Protein-Spots, der als p47, einem Co-Faktor von p97 (Kondo H, et al., 1997), identifiziert wurde. Dabei nahm die mittlere Intensität des Spots im Vergleich zur Kontrolle reproduzierbar und statistisch signifikant auf ca. 270 % zu ($p \leq 0,001$).

Die Proteomanalysen der Neuroblastomzellen nach kürzerer Behandlung mit Flufenaminsäure über 3 h, 6 h und 9 h ergaben, dass p47 schon nach 3 h auf das ungefähr 3,5-fache der Kontrolle hoch reguliert wurde. Dabei fiel auf, dass die mittlere p47-Expression nach 3 h, 6 h und 9 h höher war, als nach 12 h. Flufenaminsäure scheint also bei den Neuroblastomzellen nach Applikation eine frühe Regulation des p97-Co-Faktors p47 zu bewirken (Abb. 3.30).

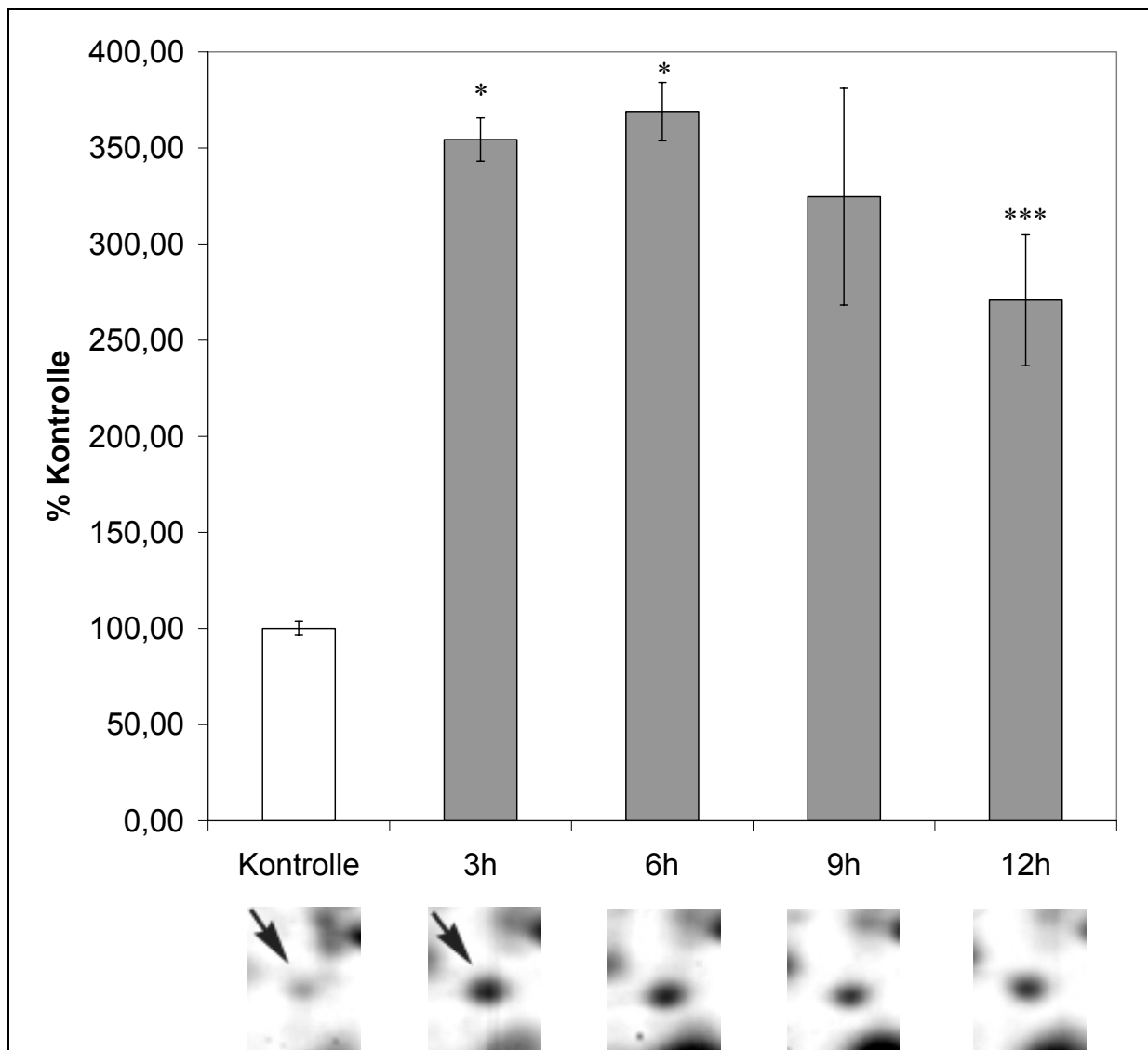


Abb. 3.30: Mittlere Intensität des durch 2D-SDS-PAGE aufgetrennten Protein-Spots p47 nach Behandlung der Neuroblastomzellen mit 500 µM Flufenaminsäure über 3 h, 6 h, 9 h und 12 h. Dargestellt ist die densitometrische Auswertung der mit Silber gefärbten Spots in Prozent, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. Die Sterne bezeichnen statistisch signifikante Unterschiede zur Kontroll-Gruppe (* : $p \leq 0,05$; *** : $p \leq 0,001$).

Für Western-Blot-Analysen mit einem polyklonalen p47-Antikörper (Meyer HH, et al., 2000) wurden die Proteine von unbehandelten und über 12 h mit 500 μ M Flufenaminsäure behandelten Neuroblastomzellen zunächst durch eindimensionale SDS-PAGE nach ihren Molekulargewichten aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membranen geblottet. Bei der anschließenden immunochemischen Detektion mit dem p47-Antikörper waren mehrere Auffälligkeiten zu beobachten. Erstens zeigte die Hauptbande bei ca. 42 kDa durch die Behandlung mit Flufenaminsäure keine Zunahme der Intensität, wie es nach den Ergebnissen der Proteomanalysen zu erwarten gewesen wäre (Abb. 3.31). Zweitens waren in der Kontroll-Gruppe zwei mittelschwache Banden und zwischen diesen eine ganz schwache Bande zu beobachten, die unter dem Einfluss von Flufenaminsäure verschwanden. Die mit diesen Banden detektierten Isoformen von p47 wiesen geringere Molekulargewichte zwischen ca. 33 und 40 kDa auf. Diese Ergebnisse beruhen auf den Beobachtungen dreier unabhängiger Versuche ($n = 3$).

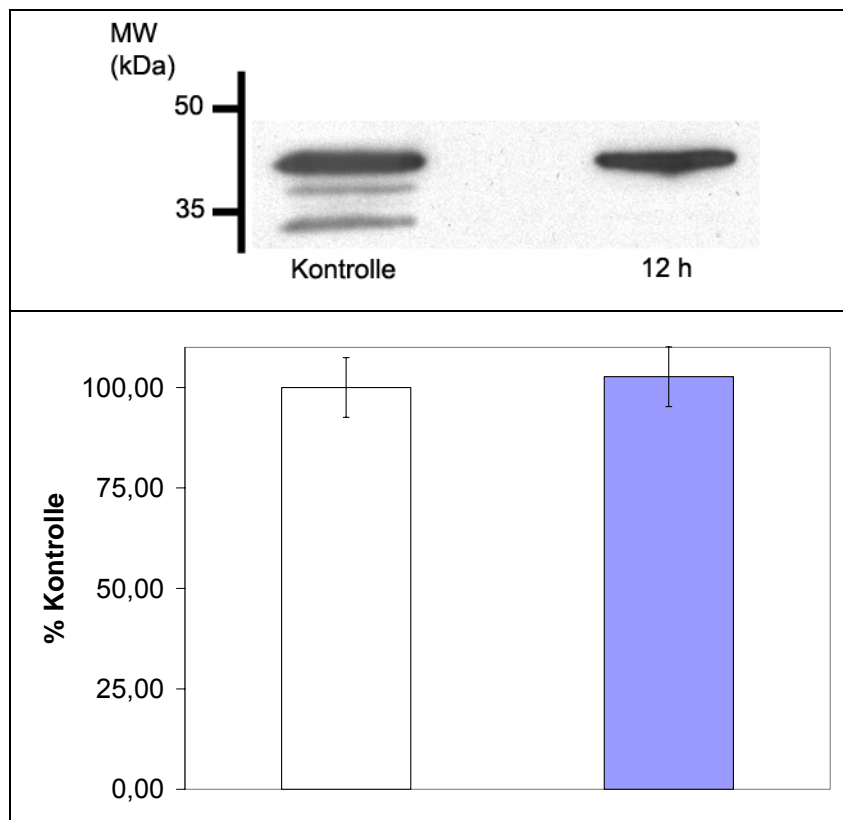


Abb. 3.31: Eindimensionale Western-Blot-Analyse von unbehandelten und mit 500 μ M Flufenaminsäure über 12 h behandelten Neuroblastomzellen mit einem polyklonalen p47-Antikörper. Das Säulendiagramm stellt das Ergebnis der densitometrischen Auswertung der mittleren Intensitäten der mit dem p47-Antikörper reagierenden oberen Bande \pm SD ($n = 3$) bei ca. 42 kDa dar. Die mittlere Intensität der Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt. Drei weitere Banden mit geringerem Molekulargewicht erschienen nur in der Kontroll-Gruppe.

Für den Bereich, in dem bei den differentiellen Proteomanalysen der p47-Spot identifiziert wurde (pI 5,2 / MW 49 kDa), wurde eine zweidimensionale Western-Blot-Analyse durchgeführt (pI ca. 5,1 – 5,3 / MW ca. 45 – 50 kDa). Dabei wurde sowohl die Position des identifizierten p47-Spots, als auch die Zunahme der Intensität unter Flufenaminsäure-Behandlung bestätigt (Abb. 3.32). Jedoch zeigte sich, dass noch andere Protein-Spots mit dem p47-Antikörper reagierten, die nur zum Teil den Spots im Silber-gefärbten 2D-Gel zuzuordnen waren. Ein Spot mit sehr geringer Intensität und geringerem Molekulargewicht war nur im Kontrollgel der unbehandelten Neuroblastomzellen zu detektieren, was das Ergebnis der eindimensionalen Western-Blot-Analyse bestätigt, dass noch andere Isoformen von p47 unter dem Einfluss von Flufenaminsäure reguliert werden.

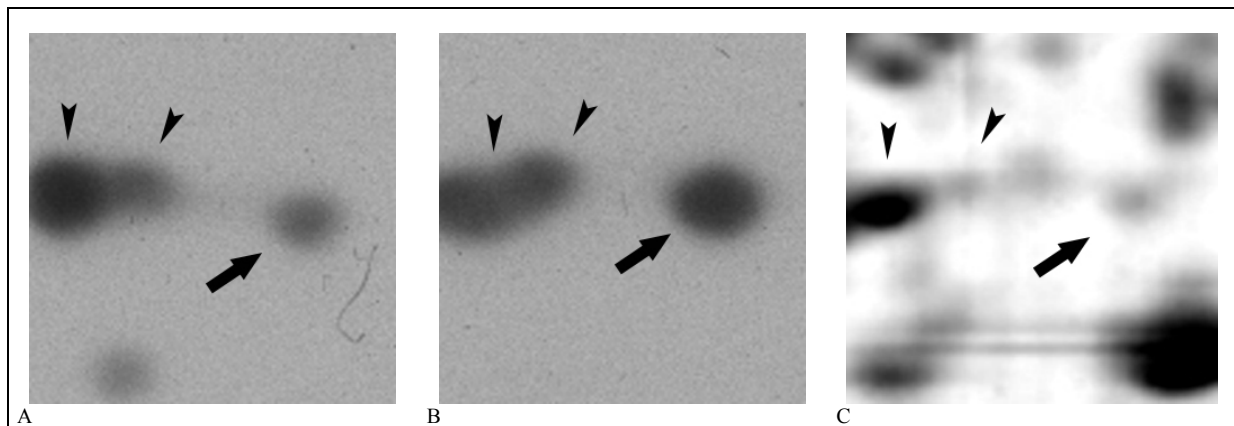


Abb. 3.32: Zweidimensionale Western-Blot-Analysen von Proteinextrakten aus unbehandelten (A) und mit 500 µM Flufenaminsäure über 12 h behandelten (B) Neuroblastomzellen mit einem polyklonalen p47-Antikörper bestätigten sowohl die Position (dicker Pfeil), als auch die Intensitätszunahme des identifizierten p47-Spots unter Behandlung mit Flufenaminsäure. Zusätzlich reagierten weitere Spots mit dem p47-Antikörper, deren Positionen im Silber-gefärbten 2D-Gel (C) nur zum Teil zugeordnet werden konnten (kleine Pfeile). Ein Spot mit sehr geringer Intensität war nach der 12-stündigen Behandlung mit Flufenaminsäure nicht mehr detektierbar.

Bei der zweidimensionalen Western-Blot-Analyse eines größeren Gelbereichs (pI ca. 4,7 – 5,3 / MW ca. 35 – 55 kDa) zeigte es sich, dass der p47-Antikörper mit einer ganzen Reihe anderer Protein-Spots, potentielle Isoformen von p47, reagierte (Abb. 3.33). Der mit dem dicken Pfeil gekennzeichnete Spot markiert das im Rahmen der Proteomanalyse ursprünglich als p47 identifizierte Protein. Die Intensitätszunahme ist allerdings aufgrund der starken Reaktion mit dem Antikörper und einer verlängerten Belichtungszeit nicht so deutlich ausgeprägt wie im Silber-gefärbten 2D-Gel oder bei der vorangegangenen zweidimensionalen Western-Blot-Analyse (Abb. 3.32).

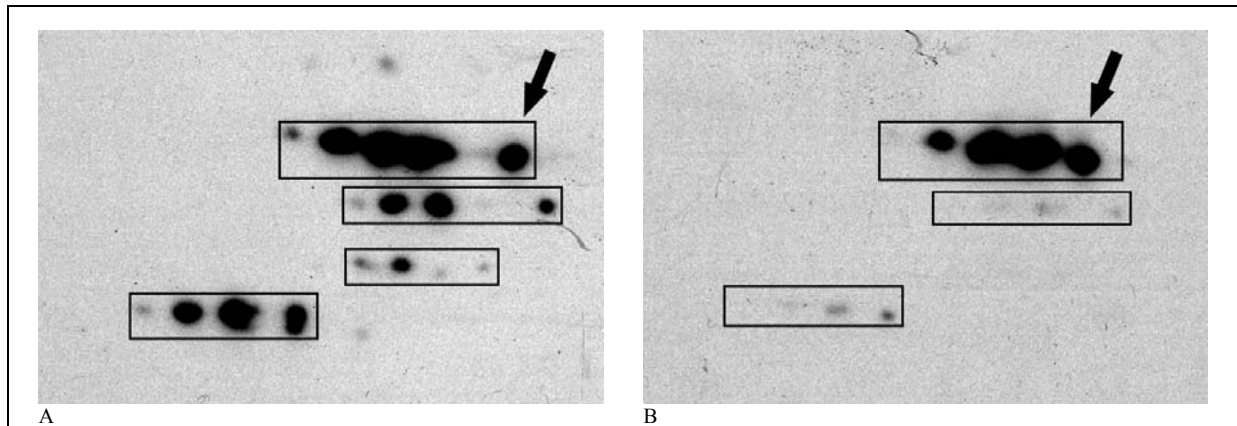


Abb. 3.33: Zweidimensionale differenzielle Western-Blot-Analyse von Proteinextrakten un behandelter (A) und mit 500 µM Flufenaminsäure über 12 h behandelter (B) Zellen der Neuroblastom-Zelllinie KELLY mit dem polyklonalen p47-Antikörper. Der mit dem Pfeil gekennzeichnete Spot entspricht dem in der differentiellen Proteomanalyse als p47 identifizierten Protein-Spot. Die detektierten Proteine befinden sich in einem Bereich von pI ca. 4,7 – 5,3 / MW ca. 35 – 55 kDa.

Die zweidimensionale Auftrennung der p47-Isoformen machte deutlich, dass jede Bande der eindimensionalen Western-Blot-Analyse aus einer Reihe von p47-Isoformen mit nahezu gleichem Molekulargewicht aber unterschiedlichen pI-Werten besteht (Abb. 3.31 – 3.33). Dabei bestätigte sich das Ergebnis der eindimensionalen Western-Blot-Analyse, dass durch die 12-stündige Behandlung der Neuroblastomzellen mit Flufenaminsäure die Expression der leichteren p47-Isoformen zurückging. Die Zunahme des als p47 identifizierten Protein-Spots könnte mit post-translationalen Modifikationen der p47-Isoformen mit dem gleichen Molekulargewicht bei 49 kDa bzw. 42 kDa erklärt werden, da auf der sauren Seite der Spot-Reihe durch die Flufenaminsäure-Behandlung ein Spot an Intensität verliert, während der besagte p47-Spot an Intensität zunimmt (Abb. 3.33). Damit gäbe es auch eine Erklärung, warum bei der eindimensionalen Western-Blot-Analyse die p47-Bande bei ca. 42 kDa unter der Behandlung mit Flufenaminsäure keine Intensitätsänderung zeigte (Abb. 3.31).

Die unterschiedlichen Molekulargewichte der den Spot-Reihen entsprechenden Banden sind mit leicht unterschiedlichem Laufverhalten der Proteine in ein- und zweidimensionalen Auftrennungen zu erklären.

Bei der Untersuchung der Expression der p47-mRNA zeigte sich durch die Behandlung der Neuroblastomzellen mit Flufenaminsäure über einen Zeitraum von 8 h keine statistisch signifikante Änderung (Abb. 3.34). Daher kann angenommen werden, dass die beobachteten Veränderungen der einzelnen Spots der p47-Isoformen entweder, wie bereits erwähnt, die Ergebnisse post-translationaler Modifikationen sind, oder durch proteolytischen Abbau zustande kommen.

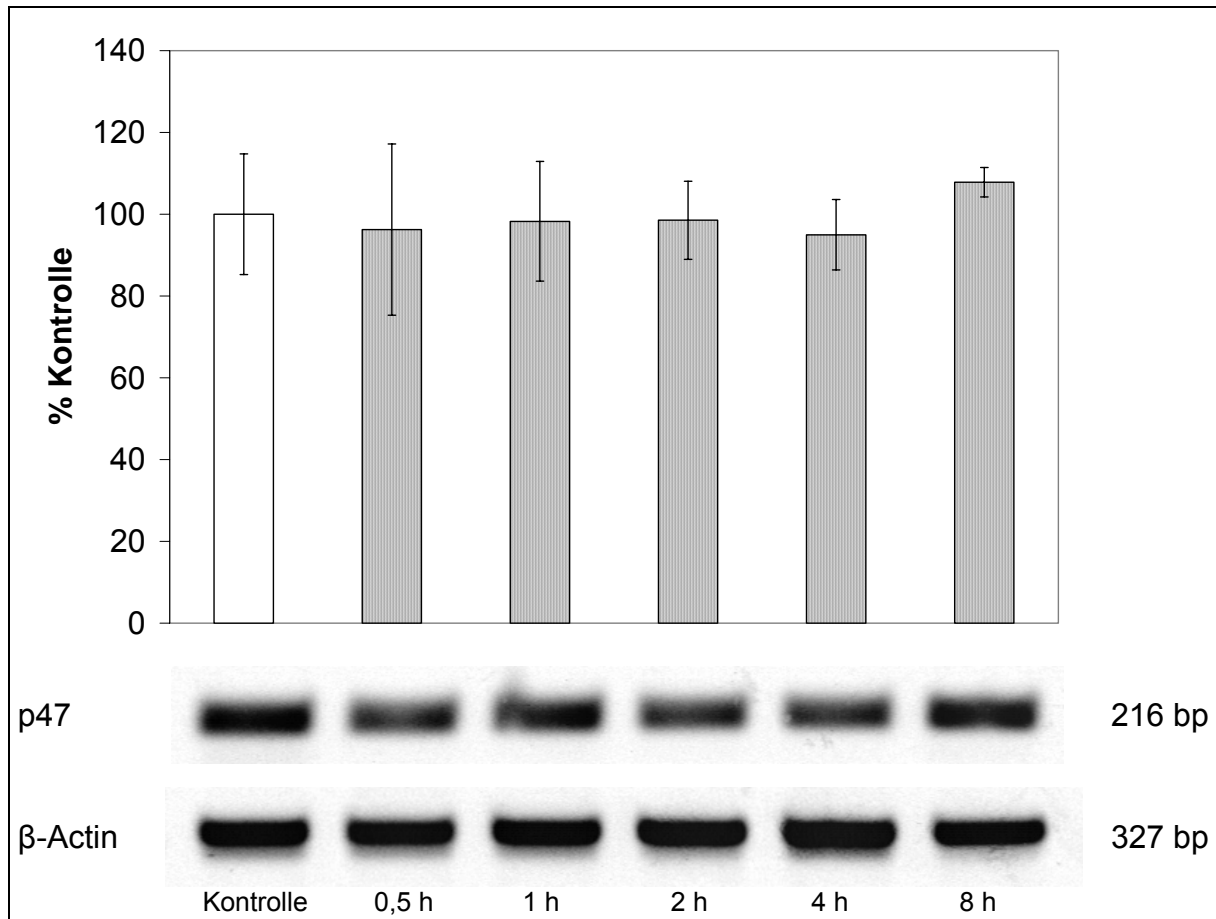


Abb. 3.34: Bestimmung der Expression der mRNA von p47 mittels RT-PCR nach Behandlung der Neuroblastom-Zelllinie KELLY mit 500 µM Flufenaminsäure über 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 8 h. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung der Banden. Dargestellt ist der Mittelwert des p47-Signals \pm SD im Verhältnis zur β -Actin-Kontrolle. Dabei wurde der Mittelwert des p47-Signals der unbehandelten Kontroll-Gruppe auf 100 % gesetzt. Bei drei unabhängigen Versuchen ($n = 3$) waren keine Veränderungen der mRNA-Expression von p47 feststellbar.

3.6.2.3. Laminin-bindendes Protein (Lbp)

Auch das Laminin-bindende Protein (Lbp) wurde unter dem Einfluss von Flufenaminsäure deutlich hoch reguliert. So nahm die Intensität des als Lbp identifizierten Protein-Spots, der im 2D-Gel bei der Position MW 42 kDa/ pI 4,8 erschien, durch 12-stündige Behandlung der Neuroblastomzellen mit 500 μ M Flufenaminsäure im Vergleich zur Kontrolle um deutlich mehr als das 2fache zu. Dieses Ergebnis war statistisch signifikant ($p \leq 0,001$).

Die Proteomanalysen für kürzere Behandlungszeiten von 3 h, 6 h und 9 h ergaben für den Lbp-Spot aufgrund der geringeren Stichproben zwar keine statistisch signifikanten Ergebnisse, da jedoch die mittleren Intensitäten des Lbp-Spots sowohl nach 3 h, als auch nach 6 h und 9 h im Vergleich zur Kontrolle zum Teil deutlich über 200 % lagen, kann man davon ausgehen, dass Lbp ebenfalls schon früh nach der Applikation von Flufenaminsäure hoch reguliert wurde (Abb. 3.35).

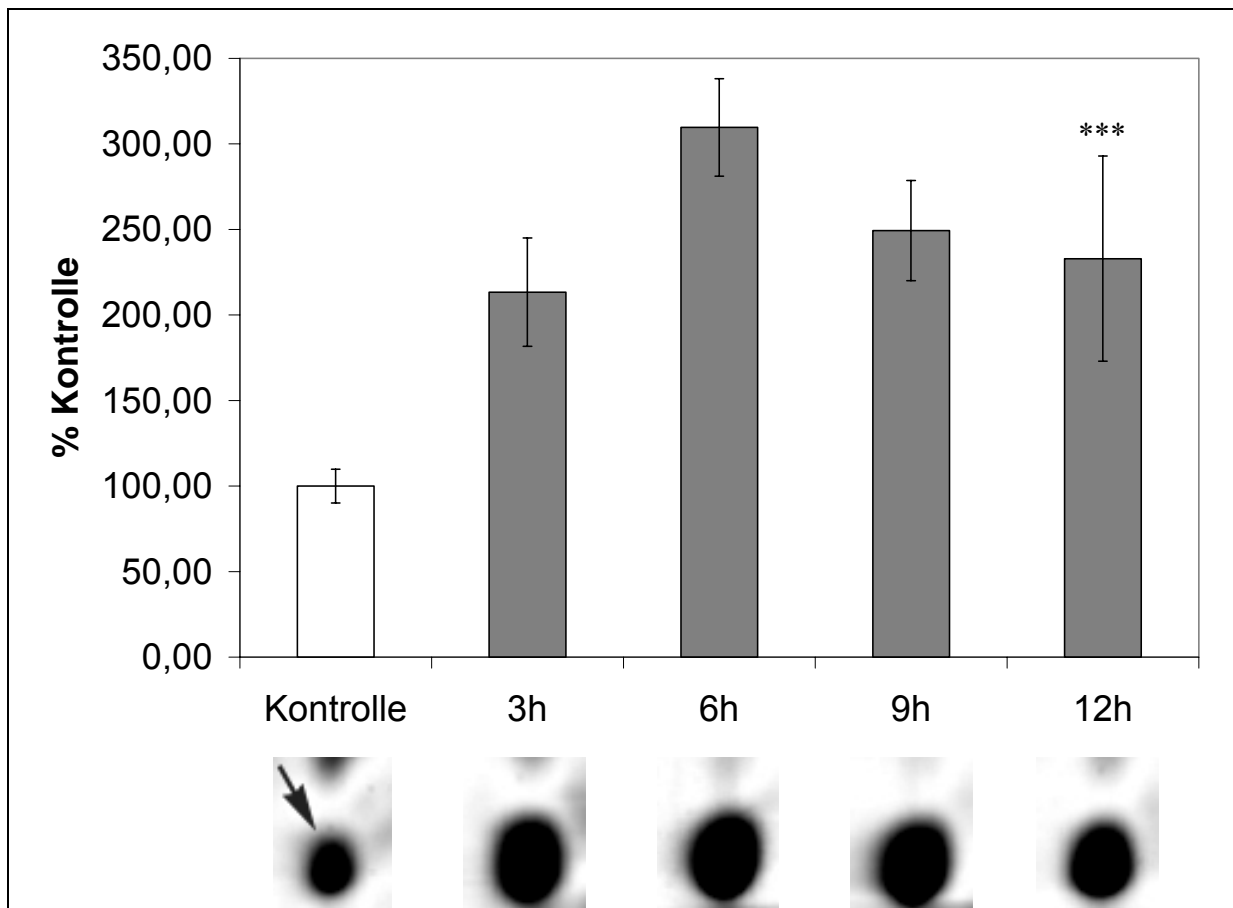


Abb. 3.35: Die mittlere Intensität des durch 2D-SDS-PAGE aufgetrennten Lbp-Spots nach Behandlung von Neuroblastomzellen mit 500 μ M Flufenaminsäure über 3 h, 6 h, 9 h und 12 h. Das Säulendiagramm gibt, bezogen auf die unbehandelten Kontroll-Proben, die densitometrische Auswertung der mit Silber gefärbten Spots in Prozent \pm SD an. Die Sterne bezeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontroll-Gruppe (***) : $p \leq 0,001$.

Um zu untersuchen, ob die auf Proteinebene beobachteten Ergebnisse sich auch in einer veränderten Expression der mRNA von Lbp widerspiegeln, wurde mittels RT-PCR die Lbp-mRNA-Expression der Neuroblastomzellen unter Behandlung mit Flufenaminsäure analysiert. Dafür wurde die Gesamt-mRNA von jeweils drei Proben ($n = 3$) nach Behandlungszeiten von 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 8 h extrahiert und der Lbp-mRNA-Gehalt semiquantitativ bestimmt (Abb. 3.36).

Überraschenderweise war das Ergebnis der mRNA-Expression gegenläufig zu den Beobachtungen der Proteinexpression von Lbp. So nahm der Lbp-mRNA-Gehalt nach 4 h Behandlung mit 500 μ M Flufenaminsäure statistisch signifikant auf ca. 60 % der Kontroll-Gruppe ab ($p \leq 0,05$), während auf Proteinebene über einen Behandlungszeitraum von 12 h eine Zunahme der Intensität des Lbp-Spots zu beobachten war (Abb. 3.35). Die Ergebnisse der Proteomanalyse für Lbp sind also nicht auf eine vermehrte Transkription zurückzuführen. Denkbar wären aber post-translationale Modifikationen, die Auswirkungen auf die Position des Lbp-Spots im 2D-Gel haben.

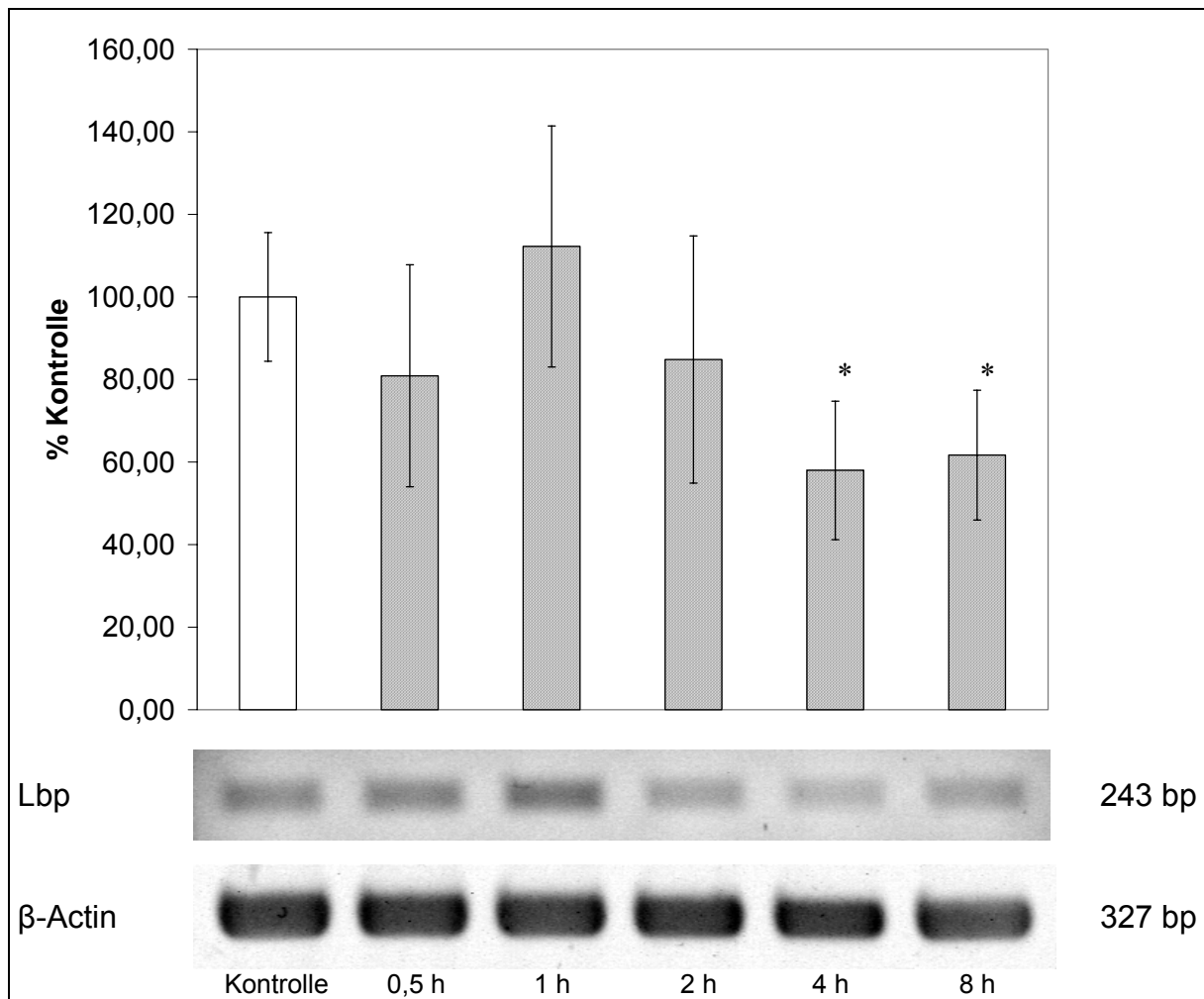


Abb. 3.36: Bestimmung der Expression der mRNA von Lbp mittels RT-PCR nach Behandlung der Neuroblastom-Zelllinie KELLY mit 500 μ M Flufenaminsäure über 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 8 h. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung der Banden der amplifizierten cDNA. Dargestellt ist der Mittelwert des Lbp-Signals \pm SD im Verhältnis zur β -Actin-Kontrolle. Dabei wurde der Mittelwert des Lbp-Signals der unbehandelten Kontroll-Gruppe auf 100 % gesetzt. Für die Behandlungszeiten von 4 h und 8 h waren die Unterschiede zur Kontroll-Gruppe statistisch signifikant ($p \leq 0,05$).

3.6.2.4. Cytosolische Malat-Dehydrogenase (MDH1)

Durch die Behandlung der Neuroblastomzellen mit Flufenaminsäure (500 μM) wurde auch die Expression der cytosolischen Malat-Dehydrogenase (MDH1) reguliert. So nahm die mittlere Intensität des MDH1-Protein-Spots nach einer Behandlung von 12 h statistisch signifikant auf nahezu 250 % der Kontrolle zu ($p \leq 0,001$).

Bei den Proteomanalysen der Neuroblastomzellen, die über 3 h, 6 h und 9 h mit Flufenaminsäure behandelt wurden, zeigte sich bereits nach 3 h eine ebenfalls statistisch signifikante Intensitätszunahme des Protein-Spots, der als MDH1 identifiziert wurde, auf gut 220 % der Kontrolle ($p \leq 0,001$). Die Ergebnisse der Untersuchungen nach 6 h und 9 h waren aufgrund der hohen Standardabweichung und der geringen Stichprobe zwar statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$), jedoch lagen die Werte ausnahmslos und zum Teil weit über 200 % der Kontrolle, so dass sie sich gut ins Gesamtbild einfügen (Abb. 3.37).

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen, dass auch für MDH1 unter dem Einfluss von Flufenaminsäure von einer frühen Hochregulierung ausgegangen werden kann.

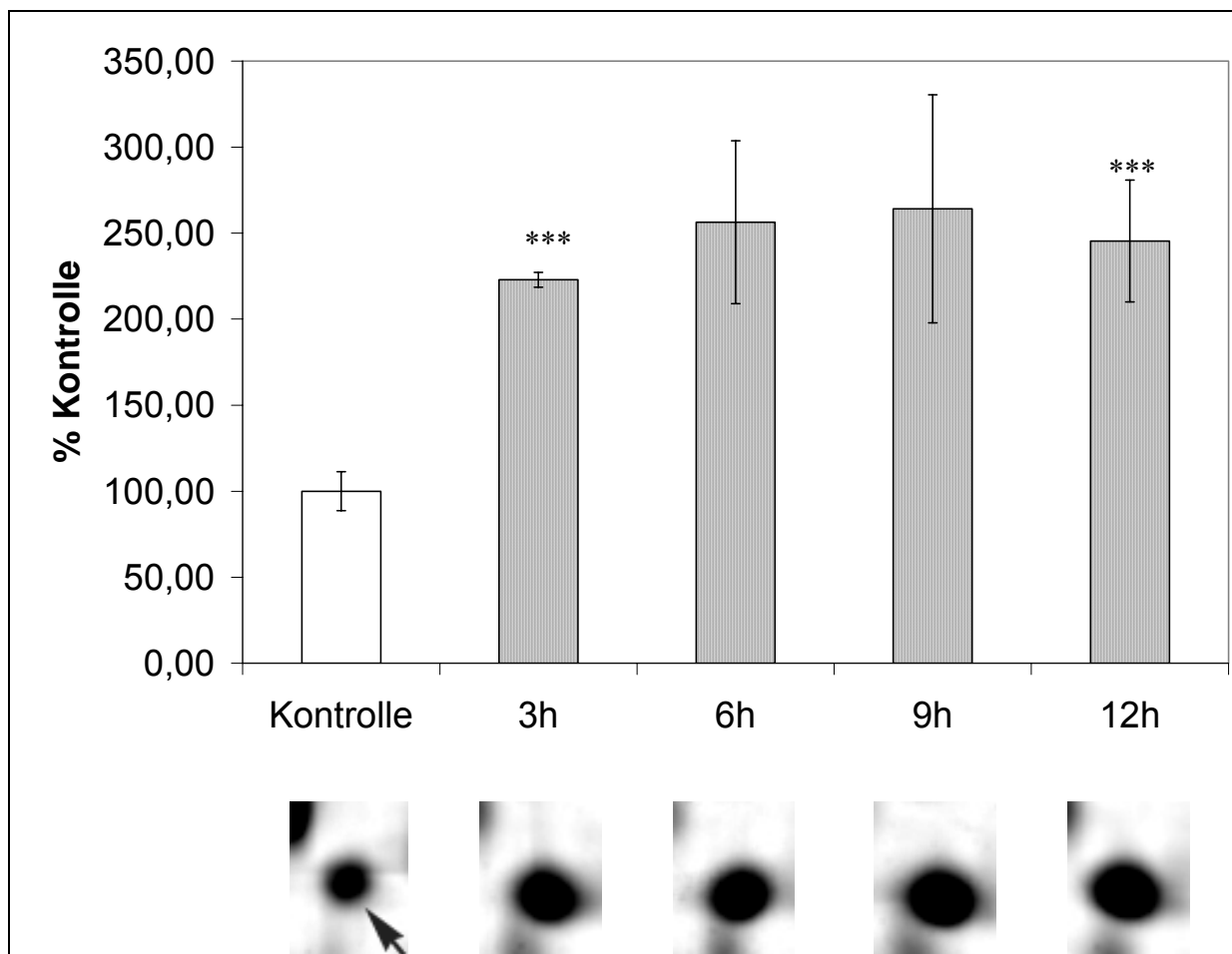


Abb. 3.37: Veränderung der mittleren Intensität des MDH1-Protein-Spots nach Behandlung von Neuroblastomzellen mit Flufenaminsäure (500 μM) über 3 h, 6 h, 9 h und 12 h, aufgetrennt durch 2D-SDS-PAGE. Dargestellt ist die densitometrische Auswertung der mit Silber gefärbten Spots als Säulendiagramm in Prozent \pm SD, bezogen auf die mittlere Intensität des MDH1-Spots der Kontrolle. Die Sterne bezeichnen statistisch signifikante Unterschiede zur Kontroll-Gruppe (***) : $p \leq 0,001$).

Mittels RT-PCR wurde der Einfluss der Flufenaminsäure auf die MDH1-mRNA-Expression untersucht. Dabei wurde erst nach 8-stündiger Behandlungszeit ein statistisch signifikanter Anstieg beobachtet ($p \leq 0,01$), während in den ersten Behandlungsstunden keine Veränderung der MDH1-mRNA-Expression analysiert werden konnte, bzw. der leichte Anstieg der mittleren Expression nach 4 h statistisch nicht signifikant war (Abb. 3.38).

Da auf Protein-Ebene die Intensitätszunahme des MDH1-Spots schon nach 3 h deutlich zu beobachten war, die mRNA-Expression aber erst nach 8 h statistisch signifikant zugenommen hatte, bleibt zu untersuchen, ob diese Veränderungen nicht getrennt voneinander zu sehen sind. So ist anzunehmen, dass die frühe Zunahme auf Proteinebene das Ergebnis translationaler bzw. post-translationaler Regulationen war, da die Transkription von MDH1 erst zu einem späteren Zeitpunkt zunahm.

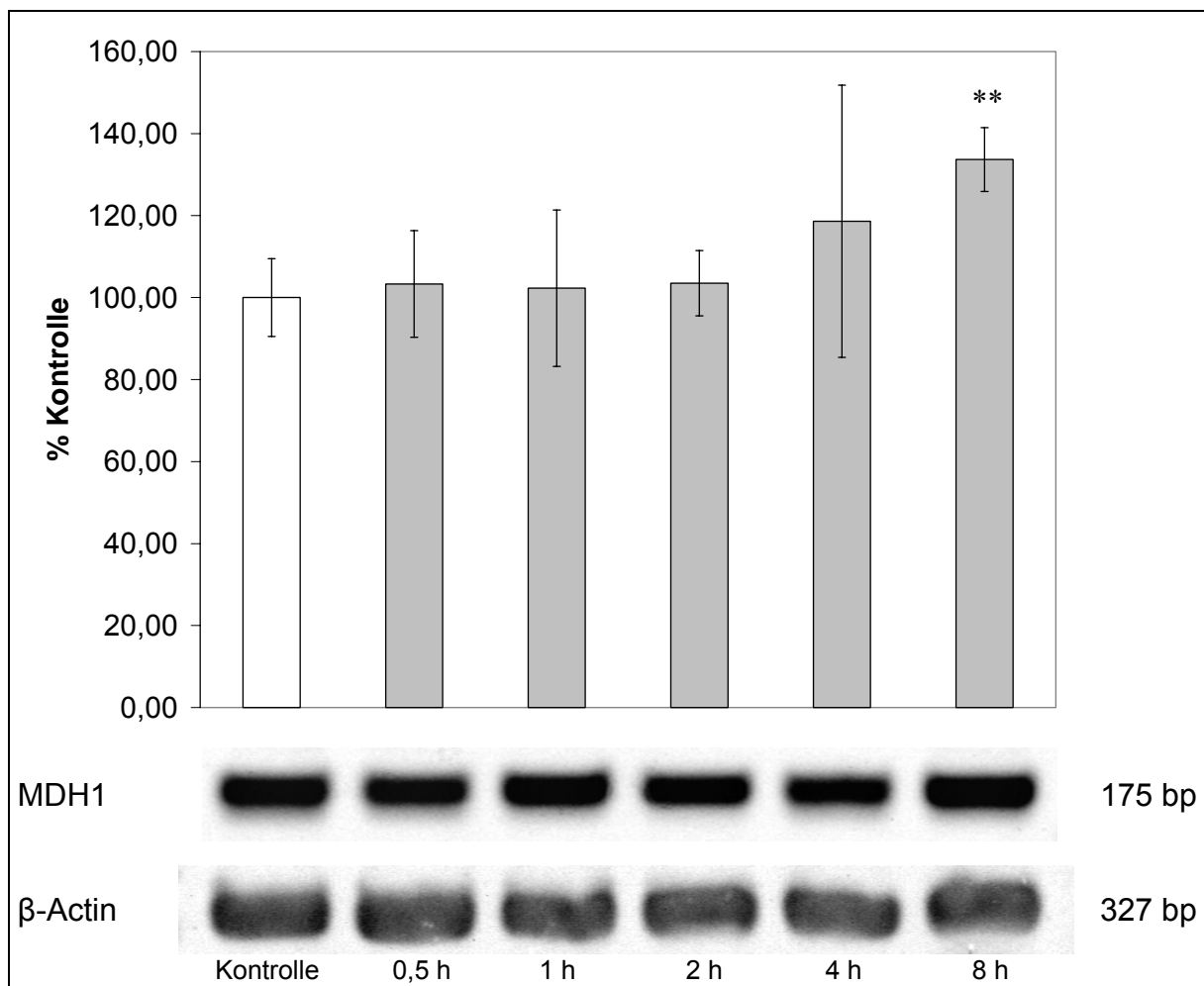


Abb. 3.38: Expression der MDH1-mRNA nach Behandlung der Neuroblastom-Zelllinie KELLY mit 500 μ M Flufenaminsäure über 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 8 h. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung der mittels RT-PCR amplifizierten cDNA-Banden. Dargestellt ist der Mittelwert des MDH1-Signals \pm SD im Verhältnis zur β -Actin-Kontrolle. Dabei wurde der Mittelwert des MDH1-Signals der unbehandelten Kontroll-Gruppe auf 100 % gesetzt. Nach 8 h Behandlungszeit war ein statistisch signifikanter Anstieg der MDH1-mRNA-Expression auf ca. 130 % der Kontrolle zu beobachten ($p \leq 0,01$).

3.6.2.5. Ribosomales Protein P0 (RbP0)

Auch die Intensität des Protein-Spots für das ribosomale Protein P0 (RbP0) nahm bei der Proteomanalyse von Neuroblastomzellen unter der Behandlung mit 500 μ M Flufenaminsäure nach 12h deutlich zu. Dabei kam es im Vergleich zur Kontroll-Gruppe zu einer Zunahme der mittleren Intensität um mehr als das 3 ½-fache. Trotz der großen Standardabweichung war das Ergebnis statistisch signifikant ($p \leq 0,001$).

Im Gegensatz zu den anderen hoch regulierten Proteinen waren bei den Proteomanalysen nach kürzeren Behandlungszeiten keine signifikanten Unterschiede der mittleren Intensität des RbP0-Spots zur Kontroll-Gruppe feststellbar. Die Einzelwerte lagen sogar zum überwiegenden Teil unter 100 % der Kontrolle (Abb. 3.39).

Aufgrund der proteomanalytischen Ergebnisse für RbP0 scheint die Regulation dieses Proteins deutlich später einzusetzen, als bei den bisher beschriebenen Proteinen.

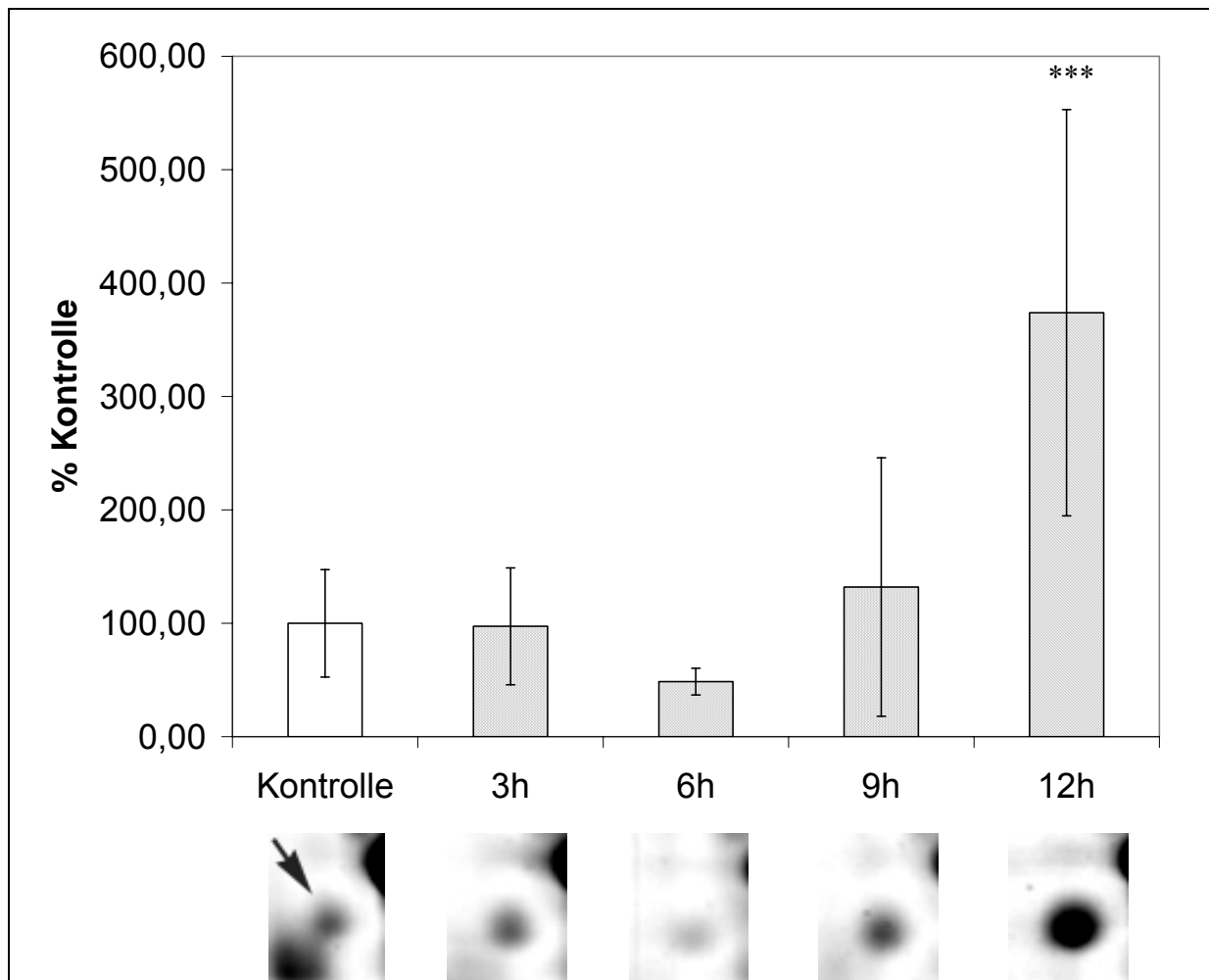


Abb. 3.39: Mittlere Intensität des Protein-Spots von RbP0 nach Behandlung von Neuroblastomzellen mit 500 μ M Flufenaminsäure über 3 h, 6 h, 9 h und 12 h. Das Säulendiagramm stellt die densitometrische Auswertung der RbP0-Spots der mit Silber gefärbten 2D-Gele dar. Die Angaben sind in Prozent \pm SD, bezogen auf die mittlere Intensität der Kontroll-Gruppe, die auf 100 % gesetzt wurde. Die Sterne bezeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrolle (***) : $p \leq 0,001$).

Bei drei unabhängigen Untersuchungen ($n = 3$) der Expression der RbP0-mRNA mittels semiquantitativer RT-PCR ergab sich durch die Behandlung der Zellen mit Flufenaminsäure über den gesamten Zeitraum von 8 h keine statistisch signifikante Veränderung (Abb. 3.40). Es war nur ein ganz leichter Anstieg der mittleren Intensität der RbP0-cDNA-Banden auf ca. 110 % der Kontroll-Gruppe zu analysieren. Aufgrund dieser Beobachtungen ist aber nicht davon auszugehen, dass die beobachteten Effekte auf Protein-Ebene das Ergebnis einer vermehrten Transkription für RbP0 ist. Es ist eher anzunehmen, dass RbP0 translational oder durch post-translationale Modifikationen reguliert wird.

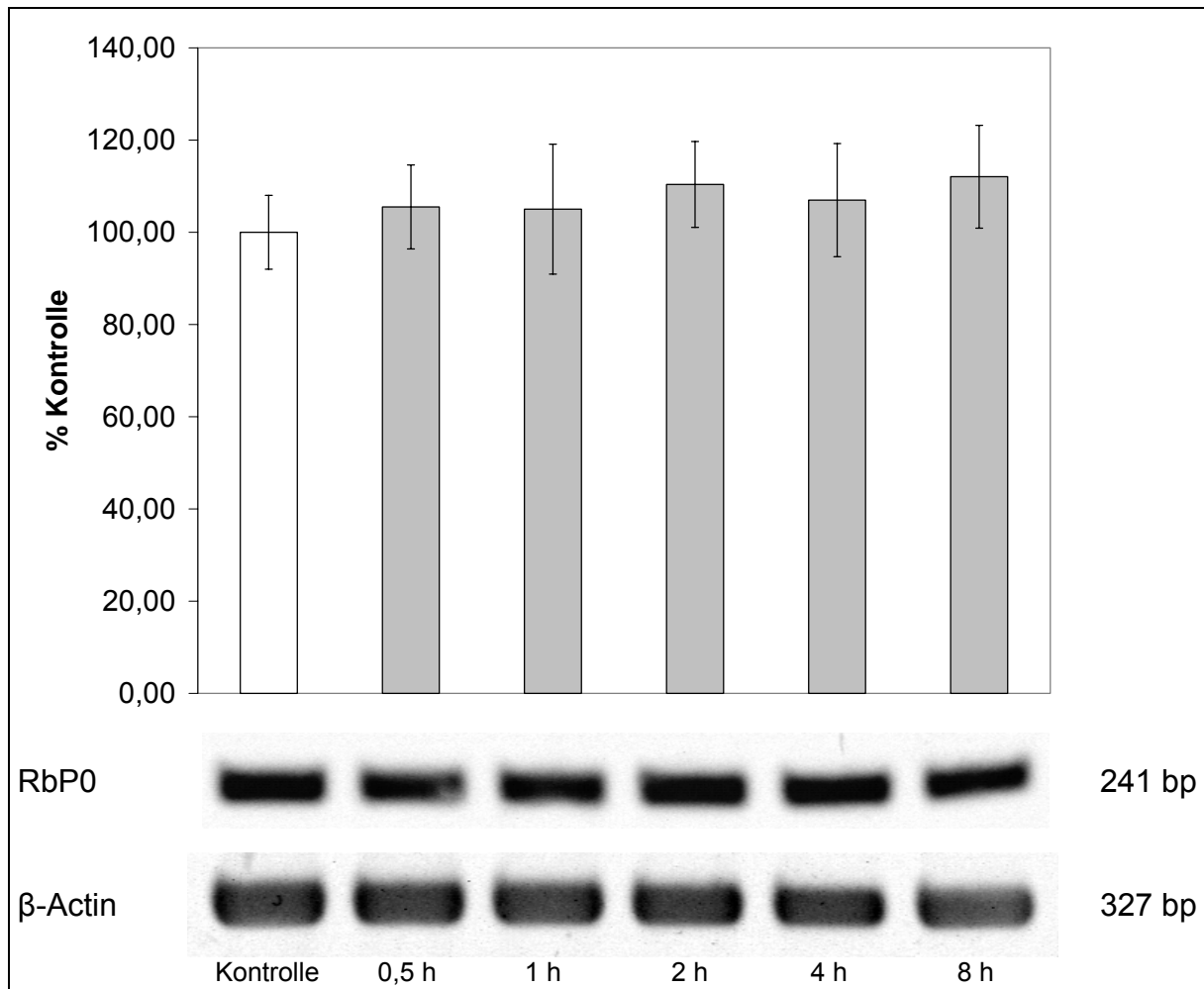


Abb. 3.40: Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung der Bestimmung der Expression der mRNA von RbP0 mittels RT-PCR nach Behandlung von Zellen der Neuroblastom-Zelllinie KELLY mit 500 μ M Flufenaminsäure über 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 8 h. Dargestellt sind die Mittelwerte der RbP0-Signale \pm SD im Verhältnis zur β -Actin-Kontrolle. Dabei wurde der Mittelwert des RbP0-Signals der unbehandelten Kontroll-Gruppe auf 100 % gesetzt. Für den Behandlungszeitraum war nur ein leichter, nicht signifikanter Anstieg der RbP0-mRNA zu beobachten. Die Daten beziehen sich auf die Ergebnisse dreier unabhängiger Versuche ($n = 3$).

3.6.2.6. Dihydrolipoamid-Acetyltransferase, Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit E2 (PDC-E2)

Die mittlere Intensität des Protein-Spots der Dihydrolipoamid-Acetyltransferase, die auch Untereinheit E2 des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (PDC-E2) genannt wird, lag nach 12-stündiger Behandlung der Zellen der Neuroblastom-Zelllinie KELLY mit 500 μ M Flufenaminsäure bei knapp 250 %, bezogen auf die mittlere Intensität des entsprechenden Spots der Kontroll-Gruppe. Dieses Ergebnis war statistisch signifikant ($p \leq 0,001$).

Betrachtet man die Ergebnisse der Proteomanalysen der Zellen, die über 3 h, 6 h und 9 h mit Flufenaminsäure behandelt wurden, so wird deutlich, dass sich für PDC-E2 die Expression schon nach 3-stündiger Behandlung mit dem NSAR deutlich und statistisch signifikant auf ungefähr 175 % der Kontrolle erhöhte ($p \leq 0,01$). PDC-E2 wird unter dem Einfluss von Flufenaminsäure also schon früh reguliert (Abb. 3.41).

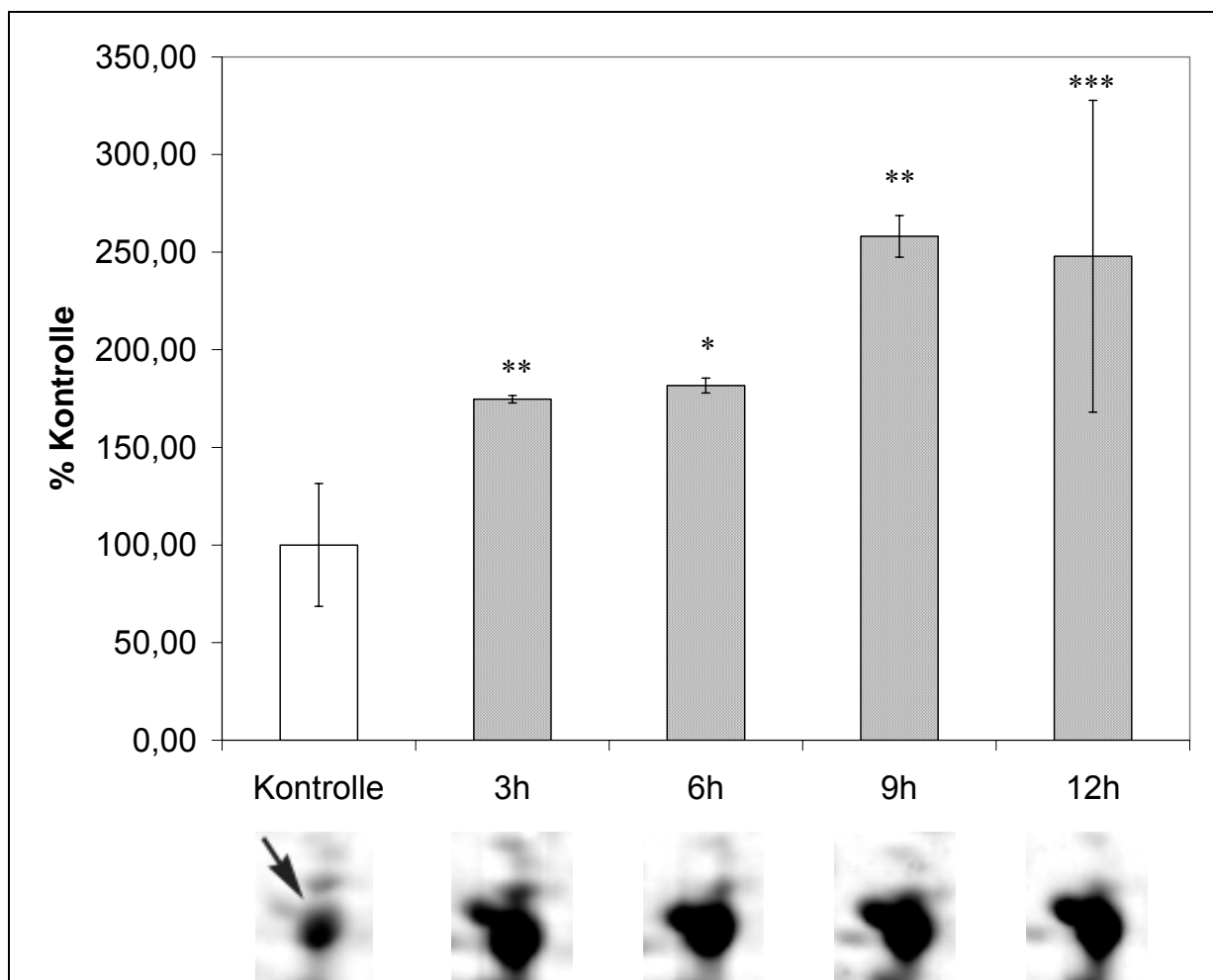


Abb. 3.41: Mittlere Intensität des durch 2D-SDS-PAGE aufgetrennten PDC-E2-Protein-Spots nach Behandlung von Neuroblastomzellen mit 500 μ M Flufenaminsäure über 3 h, 6 h, 9 h und 12 h. Das Säulendiagramm gibt, bezogen auf die unbehandelten Kontroll-Proben, die densitometrische Auswertung der mit Silber gefärbten Spots in Prozent \pm SD an. Die Sterne bezeichnen statistisch signifikante Unterschiede zur Kontroll-Gruppe (* : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$).

Um zu prüfen, ob die beobachtete Regulation des Proteins PDC-E2 auf einer veränderten Expression der mRNA von PDC-E2 beruhte, wurde eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Das eingesetzte Primer-Paar amplifizierte eine cDNA-Sequenz von 247 bp. In drei unabhängigen Versuchen ($n = 3$) war ab einer Behandlungszeit von 2 h ein leichter, jedoch statistisch nicht signifikanter Anstieg der PDC-E2-mRNA zu beobachten (Abb. 3.42). Der beobachtete starke Anstieg des PDC-E2-Gehalts auf Protein-Ebene kann sicherlich nicht oder nicht ausschließlich mit einer leicht erhöhten Transkription erklärt werden. PDC-E2 könnte auch durch vermehrte Translation und/oder post-translationale Modifikationen reguliert worden sein.

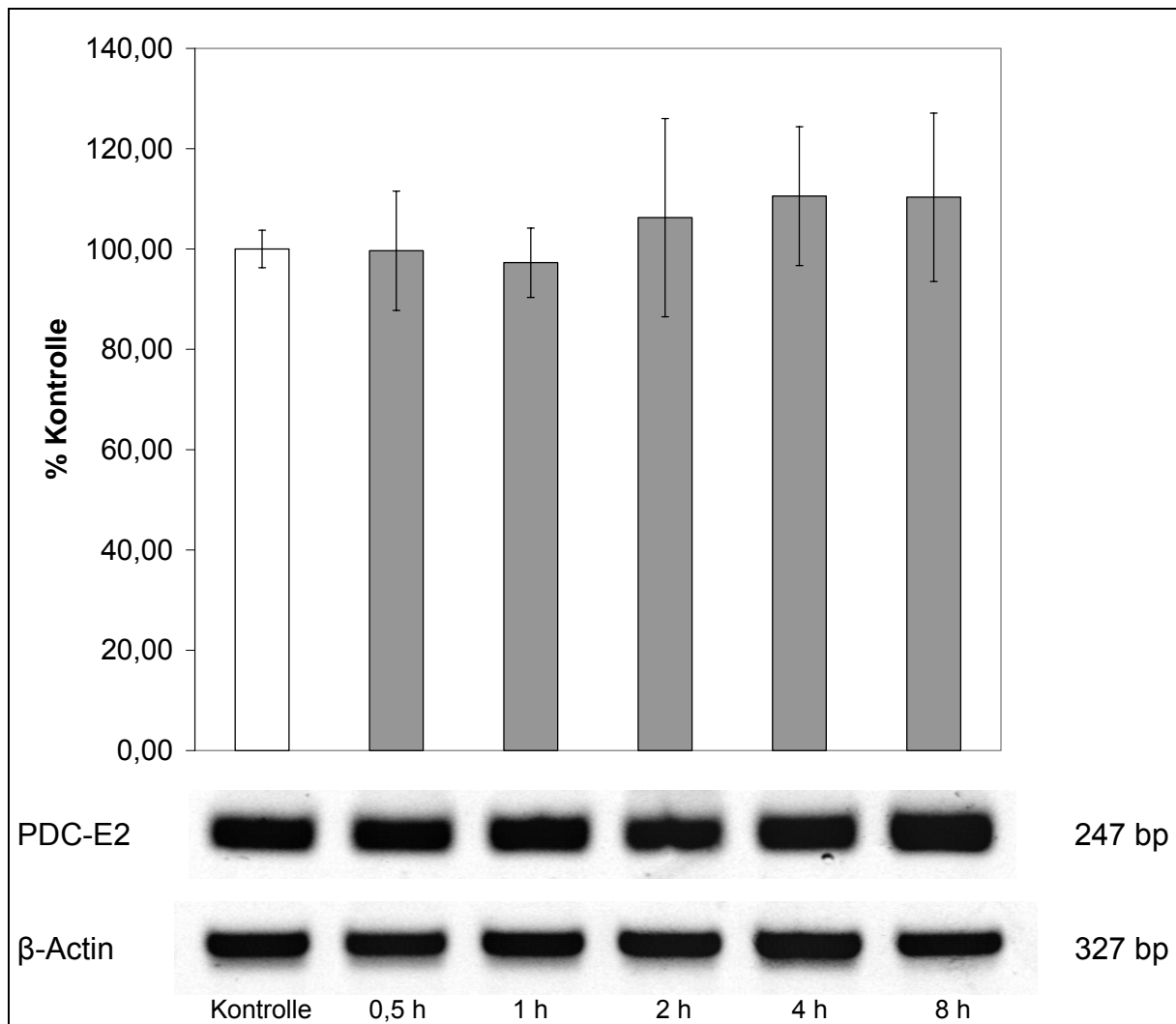


Abb. 3.42: Bestimmung der PDC-E2-mRNA-Expression mittels RT-PCR nach Behandlung der Neuroblastom-Zelllinie KELLY mit 500 μ M Flufenaminsäure über 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 8 h. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung der Banden. Dargestellt ist der Mittelwert des PDC-E2-Signals \pm SD ($n = 3$) im Verhältnis zur β -Actin-Kontrolle. Der Mittelwert des PDC-E2-Signals der unbehandelten Kontroll-Gruppe wurde als 100 % definiert. Nach 2 h Behandlungszeit war ein leichter, statistisch jedoch nicht signifikanter Anstieg an PDC-E2-mRNA zu beobachten.

3.6.3. Bei der differentiellen Proteomanalyse herunter regulierte Proteine

3.6.3.1. Heat shock cognate protein 70/54 (Hsc70/54)

Unter der Behandlung von Zellen der Neuroblastom-Zelllinie KELLY mit dem NSAR Flufenaminsäure wurden nicht nur Proteine hoch, sondern auch herunter reguliert. So nahm die Intensität des Protein-Spots, der als „Heat shock cognate protein 70/54“ (Hsc70/54) identifiziert wurde, über eine Behandlungszeit von 12 h auf knapp unter 30 % der Kontroll-Gruppe ab. Dieses Ergebnis war statistisch signifikant ($p \leq 0,001$).

Die Proteomanalysen für 3-, 6- und 9-stündige Behandlungszeiten legten für Hsc70/54 die Vermutung nahe, dass dieses Protein in den ersten 9 h Stunden nach Applikation von Flufenaminsäure reguliert wird, da die Intensität des Hsc70/54-Spots nach 3 h bei knapp unter 60 % lag, nach 6 h Behandlungszeit bereits bei ca. 36 % und nach 9 h ungefähr auf dem gleichen Niveau wie nach 12 h (Abb. 3.43). Diese Ergebnisse waren ebenfalls statistisch signifikant ($p \leq 0,001$).

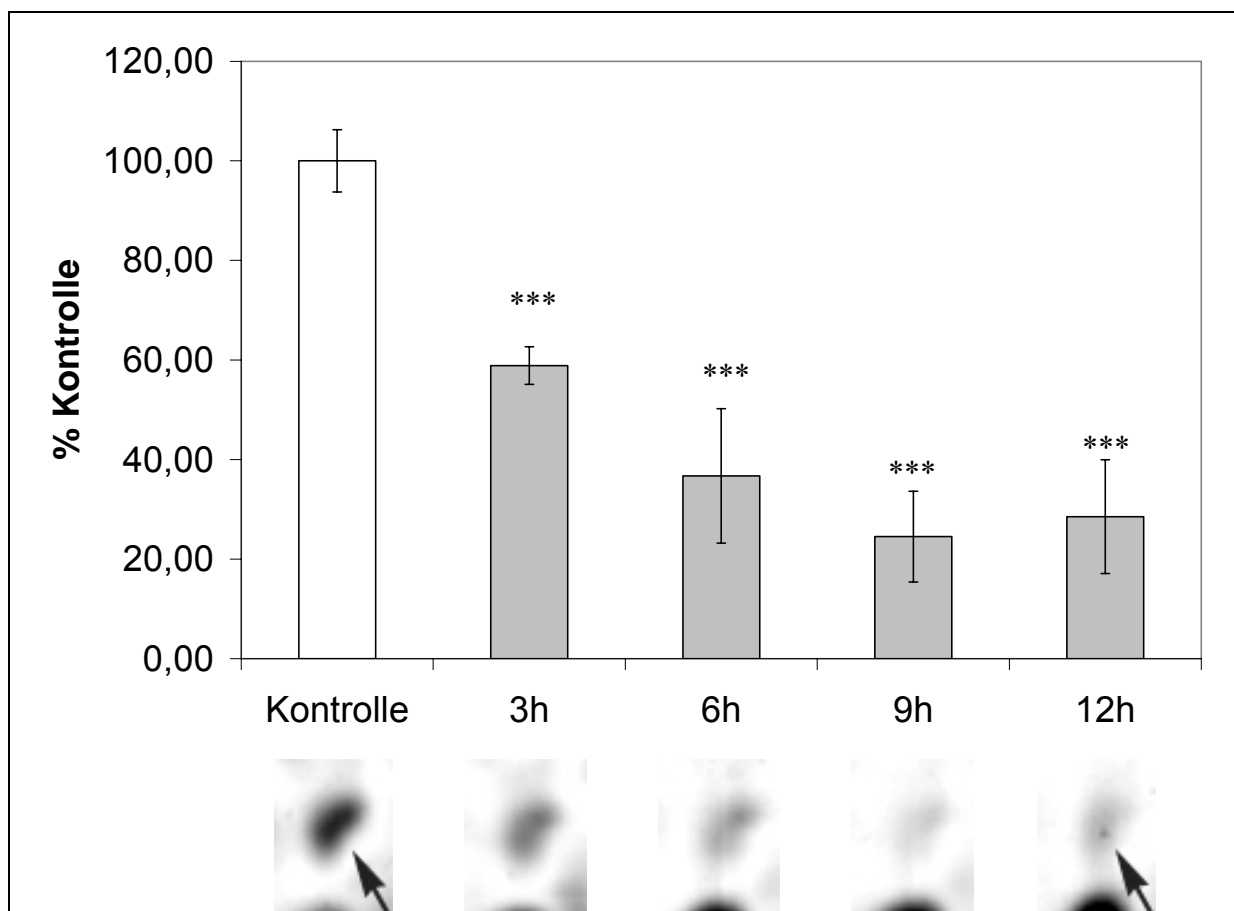


Abb. 3.43: Mittlere Intensität des durch 2D-SDS-PAGE aufgetrennten Protein-Spots von Hsc70/54 nach Behandlung von Neuroblastomzellen mit 500 µM Flufenaminsäure über 3 h, 6 h, 9 h und 12 h. Dargestellt ist die densitometrische Auswertung der mit Silber gefärbten Spots in Prozent, bezogen auf die unbehandelte Kontrolle. Die Sterne bezeichnen statistisch signifikante Unterschiede zur Kontroll-Gruppe (*** : $p \leq 0,001$).

Die durch MALDI-TOF identifizierte Protein-Sequenzen konnten sowohl zum konstitutiv exprimierten „Heat shock cognate protein 70“ (Hsc70), als zur 53,5 kDa schweren Variante von Hsc70, dem „Heat shock cognate protein 54“ (Hsc54), gehören. Aufgrund der Lage im 2D-Gel wurde der Protein-Spot zunächst dem Hsc54 zugeordnet. Zur Bestätigung der Position und Identität des differentiell exprimierten Protein-Spots wurden Western-Blot-Analysen mit einem monoklonalen Antikörper unternommen, der sowohl mit Hsc70 als auch mit Hsc54 reagierte (Tsukahara F, et al., 2000).

Durch zweidimensionale Western-Blot-Analysen für den interessierenden Bereich, in dem der Hsc54-Spot bei der differentiellen Proteomanalyse detektiert wurde (ca. pI 4,5 – 5,0 / MW 34 – 55 kDa), zeigte sich, dass nicht nur der als Hsc54 identifizierte Spot mit dem Hsc70-Antikörper reagierte, sondern noch weitere Spots, die unter dem Einfluss von Flufenaminsäure zum Teil ebenfalls deutlich reguliert wurden (Abb. 3.44). Sowohl die Positionen, als auch die Intensitäten stimmten mit denen in den Silber-gefärbten 2D-Gelen überein. Die Intensitäten der in diesem Bereich detektierten Spots nahmen durch eine 12-stündige Behandlung mit 500 μ M Flufenaminsäure unterschiedlich stark ab.

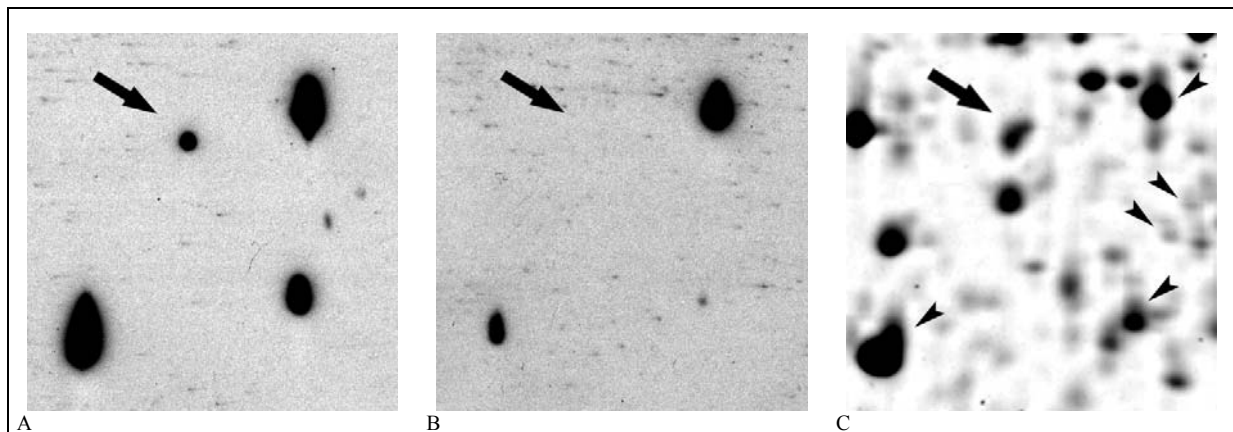


Abb. 3.44: Zweidimensionale Western-Blot-Analysen von Proteinextrakten aus unbehandelten (A) und mit 500 μ M Flufenaminsäure über 12 h behandelten (B) Neuroblastomzellen mit einem monoklonalen Hsc70-Antikörper bestätigten im interessierenden Bereich sowohl die Position (dicker Pfeil), als auch differentielle Expression des identifizierten Hsc70/54-Spots. Zusätzlich wurden noch fünf weitere Spots detektiert, deren Positionen im Silber-gefärbten 2D-Gel (C) eindeutig zugeordnet werden konnten (kleine Pfeile) und die nach Behandlung mit Flufenaminsäure ebenfalls einen mehr oder weniger stark ausgeprägten Intensitätsverlust aufwiesen.

Im oberen rechten Viertel des Kontroll-Gels der zweidimensionalen Western-Blot-Analyse (Abb. 3.44 (A)) wurden zwei Protein-Spots mit sehr schwacher Intensität detektiert, die nach Behandlung mit Flufenaminsäure gar nicht mehr detektierbar waren. Bei einer weiteren Western-Blot-Analyse dieses Bereichs mit einer Hsc70-Antikörperlast, durch die der stärkste Spot im Kontroll-Gel bereits übersättigt zu sein schien, wurden die beiden genannten Spots in der unbehandelten Kontrolle deutlich detektiert, während sie wie bei der vorigen 2D-Western-Blot-Analyse nach Behandlung mit Flufenaminsäure nicht mehr nachweisbar waren (Abb. 3.45). Zusätzlich wurden im Kontroll-Gel um den gesättigten Protein-Spot herum drei weitere Spots detektiert, die nach Flufenaminsäure-Behandlung ebenfalls nicht mehr nachweisbar waren. Diese drei Protein-Spots wurden in keinem mit Silber gefärbten 2D-Gel

detektiert, und auch im Western-Blot wies einer von diesen nur eine äußerst geringe Intensität auf, was die Unterschiede und Grenzen der verschiedenen Detektionsverfahren deutlich macht.

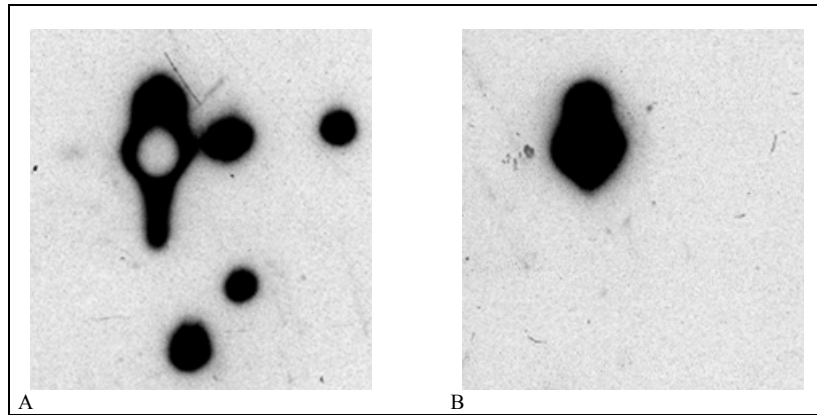


Abb. 3.45: Zweidimensionale differenzielle Western-Blot-Analyse von Proteinextrakten unbehandelter (A) und mit 500 µM Flufenaminsäure über 12 h behandelter (B) Zellen der Neuroblastom-Zelllinie KELLY. Der stärkste Protein-Spot liegt in der Position von ca. pI 4,9 / MW 50 kDa. Der Ausschnitt umfasst einen Bereich von ca. Δ pI 0,25 und Δ MW 10 kDa.

Während eine 2D-Western-Blot-Analyse auf einen bestimmten pI/MW-Bereich beschränkt ist, konnte bei einer eindimensionalen Western-Blot-Analyse die gesamte Expression von Hsc70/54 untersucht werden, jedoch nur aufgetrennt nach den Molekulargewichten (Abb. 3.46). So schienen sich einerseits einige der Ergebnisse aus den zweidimensionalen Untersuchungen zu bestätigen, andererseits wurden auch Banden detektiert, die außerhalb des MW-Bereichs der 2D-Western-Blots lagen. So tauchte bei einem Molekulargewicht von ca. 70 kDa sowohl für die Kontrollen, als auch für die mit Flufenaminsäure behandelten Zellen eine starke Bande auf, die bei einer Hsc70-Antikörperversäuerung von 1 : 1000 so übersättigt war, dass sie densitometrisch nicht mehr analysiert werden konnte. Da die Positiv-Kontrolle des HeLa-Zelllysats ebenfalls auf der Höhe von 70 kDa lag, war davon auszugehen, dass es sich bei dieser Bande um das in der Literatur beschriebene konstitutiv exprimierte Hsc70 handelte (Dworniczak B, Mirault ME, 1987).

Darunter folgten drei Banden bei ca. 55, 50 und 35 kDa, die vom Molekulargewicht her ungefähr im Bereich des 2D-Gelausschnitts lagen und durch den Einfluss von Flufenaminsäure deutlich herunter reguliert wurden. Die Zuordnung dieser Banden zu den einzelnen Protein-Spots, die mit dem Hsc70-Antikörper reagierten, ist allerdings schwierig, da die ermittelten Molekulargewichte nicht genau übereinstimmten, was an unterschiedlichem Laufverhalten der eindimensionalen und zweidimensionalen Auftrennung während der SDS-PAGE liegen kann. Außerdem tauchten die gering exprimierten Proteine im Bereich zwischen 50 und 35 kDa nicht auf, da für die eindimensionale SDS-PAGE nur 1/10 der Proteinmenge eingesetzt werden konnte. Zudem werden Proteine mit ähnlichen Molekulargewichten aber unterschiedlichen pI-Werten nicht aufgetrennt, so dass sie im 1D-Western-Blot als eine einzelne Bande erscheinen. So setzt sich die Bande bei 35 kDa (Abb. 3.46 (C)) mindestens aus den beiden Proteinen mit fast identischem Molekulargewichten bei 35 kDa zusammen, die

aber voneinander abweichende pI-Werte besitzen (Abb. 3.44). Diese Bande wird, wie nach der 2D-Western-Blot-Analyse zu erwarten war, herunter reguliert.

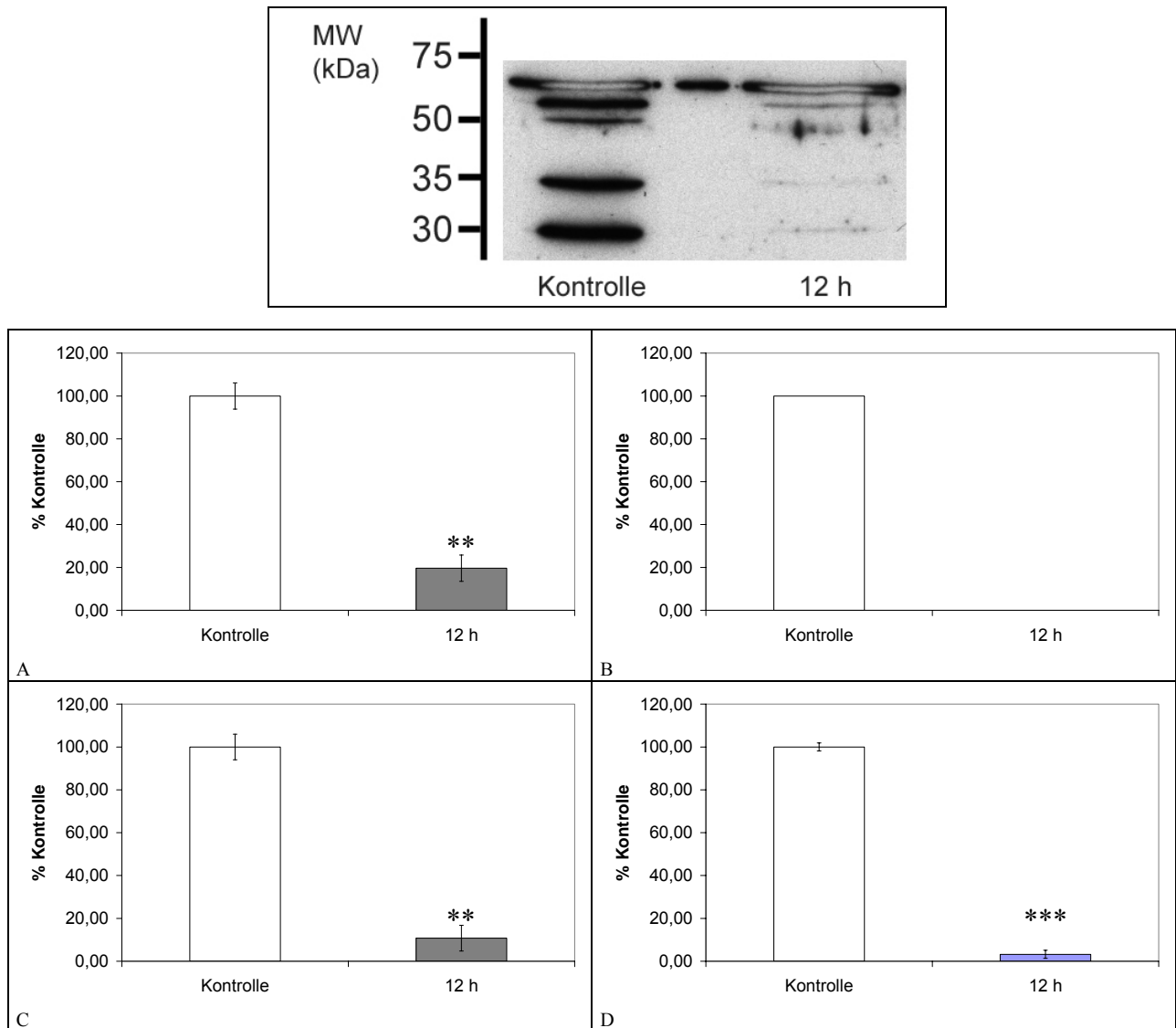


Abb. 3.46: Eindimensionale Western-Blot-Analyse mit Hsc70-Antikörper von unbehandelten und über 12 h mit 500 μ M Flufenaminsäure behandelten Neuroblastomzellen. Als Positivkontrolle diente ein HeLa-Zelllysate (kleine Bande bei 70 kDa zwischen den Banden). Die Säulendiagramme stellen die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der mittleren Intensitäten der mit Hsc70-Antikörper reagierenden Banden \pm SD ($n = 3$) bei (A) 55 kDa (zweite Bande von oben), (B) 50 kDa, (C) 35 kDa und (D) 30 kDa dar. Die mittleren Intensitäten der jeweiligen Kontrolle wurden dabei mit 100 % angesetzt. Die Sterne bezeichnen statistisch signifikante Unterschiede (** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$).

Weitere vorsichtige Vergleiche der Protein-Banden mit den Protein-Spots im 2D-Western-Blot legen nahe, dass die Bande bei ca. 55 kDa (Abb. 3.46 (A)) dem starken Spot im oberen Teil des 2D-Western-Blots bei ca. 50 kDa entspricht (Abb. 3.44 und 3.45). Diese Bande wurde deutlich herunter reguliert. Eine solche Aussage war für den Spot wegen der starken Sättigung nicht zu machen. Die dünnere Bande bei ca. 50 kDa (Abb. 3.46 (B)) könnte dem ursprünglich durch MALDI-TOF und Datenbank-Recherchen als Hsc54 identifizierten Protein-Spot entsprechen. Damit würde das Ergebnis aus Proteomanalyse und 2D-Western-Blot bestätigt. Darüber hinaus wurde noch eine Bande bei ca. 30 kDa detektiert

(Abb. 3.46 (D)), die außerhalb des Bereichs der zweidimensionalen Western-Blot-Analyse lag und unter der Behandlung mit Flufenaminsäure ebenfalls herunter reguliert wurde. Spots, die eventuell außerhalb des in den 2D-Western-Blot-Analysen untersuchten pI-Bereichs lagen, konnten bei diesen Vergleichen natürlich nicht berücksichtigt werden.

Durch weitere Verdünnung des Hsc70-Antikörpers um den Faktor 10 auf 1 : 10.000 konnten auch für die starke Bande bei 70 kDa Unterschiede zwischen den mit Flufenaminsäure behandelten Proben und den Kontrollproben ermittelt werden (Abb. 3.47). So wurde Hsc70 unter dem Einfluss von Flufenaminsäure im Gegensatz zu allen anderen Ergebnissen für Hsc70/54 um einen Faktor von nahezu 3,5 hoch reguliert.

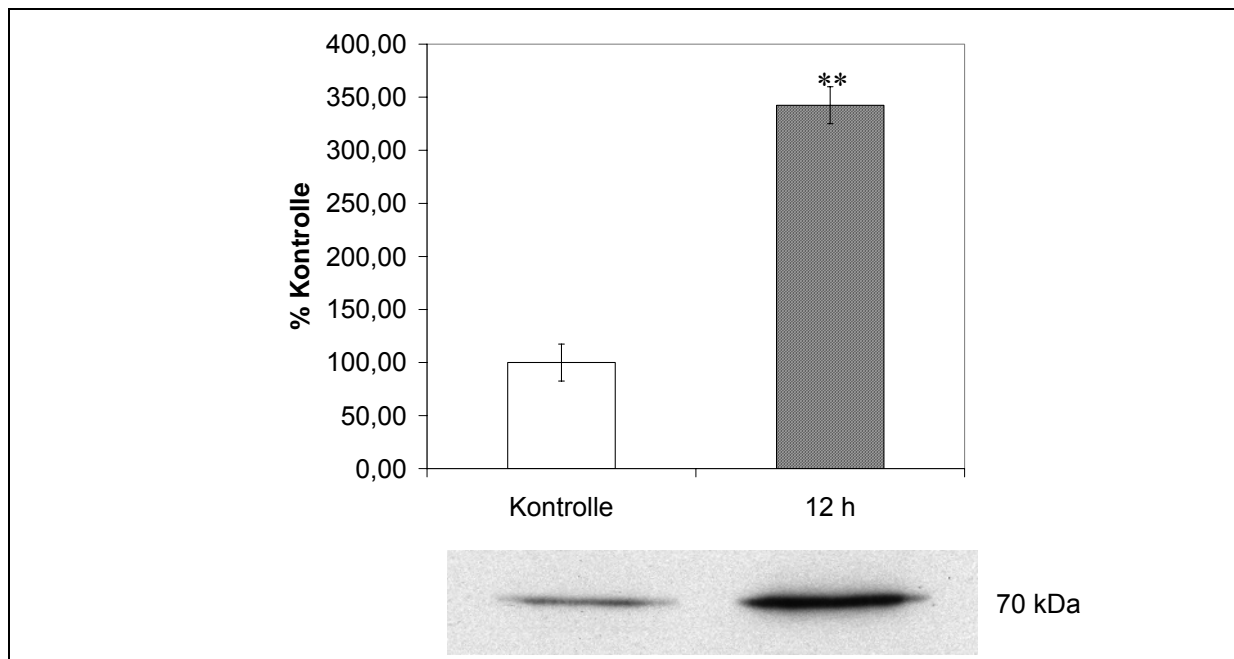


Abb. 3.47: Western-Blot mit Hsc70-Antikörper von Neuroblastomzellen nach 12-stündiger Behandlung mit 500 µM Flufenaminsäure. Dargestellt ist die mittlere Intensität der Bande bei ca. 70 kDa \pm SD (n = 2) nach Verdünnung des Primär- und des Sekundärantikörpers auf 1 : 10.000 und 1 : 20.000. Die mittlere Intensität der Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt. Die zwei Sterne markieren einen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrolle ($p \leq 0,01$).

Um auf der Ebene der Transkription die Regulation von Hsc70/54 unter dem Einfluss von Flufenaminsäure über einen Zeitraum von 8 h zu überprüfen, sollte mittels RT-PCR der Gehalt an Hsc70- bzw. Hsc54-mRNA zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht werden. F. Tsukahara et al. geht für die transkriptionale Regulation von Hsc70/54 von alternativem Spleißen aus (Tsukahara F, et al., 2000). Durch RT-PCR und Sequenzanalysen konnten in der zitierten Arbeit wirklich zwei unterschiedlich lange cDNA-Sequenzen nachgewiesen werden (Abb. 3.48). Ein langes cDNA-Produkt, das dem Hsc70 entspricht, und ein um 153 Aminosäuren verkürztes Produkt für Hsc54. Ein Primer-Paar, das in der Arbeit von F. Tsukahara eingesetzt wurde, fand auch für die vorliegende Arbeit Verwendung. Es umschließt die für Hsc54 fehlende Sequenz, so dass mittels einer RT-PCR sowohl der Hsc70-, als auch der Hsc54-mRNA-Gehalt untersucht werden konnte.

```

1 ctcattgaac tcgctgcag ctctgggtt tttgtggct tcttcgtta ttgagccag
61 gcctacacc cagcaaccat gtccaaggga cctgcagtg gtattgatc ttgcaccac
121 tactctgtg tgggtgttt ccagcacgga aaagtcgaga taattgcaa tgatcaggga
181 aaccgaacca ctccaagcta tgcgccttt acggacactg aacggttgat cggtgatgcc
241 gcaaagaatc aagtgcgaat gaacccacc aacacagttt ttgatgcaa acgtctgatt
301 ggacgcagat ttgatgatc tgtgtccag tctgatatga aacattggcc ctttatgtg
361 gtgaatgatg ctggcaggcc caaggtccaa gtagaataca agggagagac caaaagcttc
421 tatccagagg aggtgtctc tatgttctg acaaatga aggaattgc agaagcctac
481 ctgggaaga ctgtacaa tgctgtggtc acagtccag ctactttaa tgactctcag
541 cgtcaggcta ccaaatgac tgaactatt gctggtctca atgtacttag aattattaat
601 gagccaactg ctgctgctat tgctacggc ttagacaaaa aggttggagc agaaagaaac
661 gtgctcatc ttgactggg aggtggcact ttgatgtgt caatcctac tattgaggat
721 ggaatcttg agtcaagtc tacagctgga gacaccact tgggtggaga agattttgac
781 aaccgaatgg tcaaccattt tattgctgag ttaagcgca agcataagaa ggacatcagt
841 gagaacaaga gagctgaag acgcctccgt actgcttggt aacgtgctaa gcgtaccctc
901 tctccagca cccaggccag tattgagatc gattctctc atgaaggaat cgactctat
961 acctccatta cccgtccccg attgaagaa ctgaatgctg acctgttccg tggcaccctg
1021 gaccagtag agaaagccct tcgagatgcc aaactagaca agtcacagat tcatgatatt
1081 gtctggttg gtgttctac tegtatcccc aagattcaga agcttctcca agacttctc
1141 aatggaaaag aactgaataa gagcatcaac cctgatgaag ctgttgctta tggtcagct
1201 gtccaggcag ccattctgtc tggagacaag tctgagaatg tcaagattt gctgctct (F) → tg
1261 gatgtcactc ctcttccct tggattgaa actgctggtg gactcatgac tgcctcatc
1321 aagcgaata ccaccattcc taccaagcag acacagacct tcactaccta ttctgacaac
1381 cagcctggg tgcttattca ggtttatgaa ggcgagcgtg ccatgacaaa ggataacaac
1441 ctgcttgga agtttgaact cacaggcata cctctgcac cccgaggtgt tctcagatt
1501 gaagtcactt ttgacattga tgccaatggt atactcaatg tctctgctgt ggacaagagt
1561 acgggaaaaag agaacaagat tactatcact aatgacaagg gccgtttgag caagggaagc
1621 attgaacgta tggtcaggga agctgagaag tacaagctg aagatgagaa gcagagggac
1681 aaggtgcat ccaagaatc acttgagtc tatgcttca acatgaaagc aactgttgaa
1741 gatgagaaac ttcaaggcaa gattaacgat gaggacaaac agaagattct ggacaagtgt
1801 aatgaaatta tcaactggct tgataagaat cagactgctg agaaggaaga attgaacat
1861 caacagaaag agctggagaa agtttgcaac cccatcatca ccaagctgta ccagagtga
1921 ggaggcatgc caggaggaat gcctggggga ttctctggtg gtggagctcc tcctctggt
1981 ggtgcttct cagggccac cattgaagag gttgattaa ccaaccaagt ← (R) gtatgtag
2041 cattgtcca cacattaaa acattgaag gacctaaatt cgtagcaaat tctgtggcag
2101 ttttaaaaag ttaagctgct atagtaagt actgggcatt ctcaatact gaatatgaa
2161 catatgaca ggggaaggaa ataactgc acttataaa cactgtattg taagtggaa
2221 atgcaatgct taaataaaa ctatttaaaa ttggcaccat aaaaaaaaaa aaaaaa

```

Abb. 3.48: Nukleotidsequenz der cDNA von Hsc70 und Hsc54. Die cDNA-Sequenz für Hsc54 ist um die in grauen Buchstaben geschriebene Sequenz (nt 1466 – 1924) verkürzt. Das AT(U)G-Start- (nt 79 – 81) und das T(U)AA-Stopp-Codon (nt 2017 – 2019) sind fett und unterstrichen geschrieben. Die grau hinterlegten Sequenzen markieren die Bereiche der cDNA, an denen sich die Vorwärts- (F) und Rückwärts-Primer (R) anlagern. Die Primer umschließen die bei der Hsc54-cDNA fehlende Sequenz.

Bei der RT-PCR dreier unabhängiger Proben ($n = 3$) wurde deutlich, dass über die gesamte Behandlungszeit von 8 h kein Signal für Hsc54, das bei 313 bp hätte liegen müssen, detektiert werden konnte.

Jedoch waren für jeden untersuchten Zeitpunkt deutliche Banden knapp unter 800 bp zu detektieren, wodurch die transkriptionale Expression von Hsc70 (772 bp) nachgewiesen werden konnte. Über den Zeitraum der Behandlung mit 500 μ M Flufenaminsäure ergaben sich zwar leichte Veränderungen der mRNA-Expression, diese wiesen jedoch im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle keine statistische Signifikanz auf (Abb. 3.49).

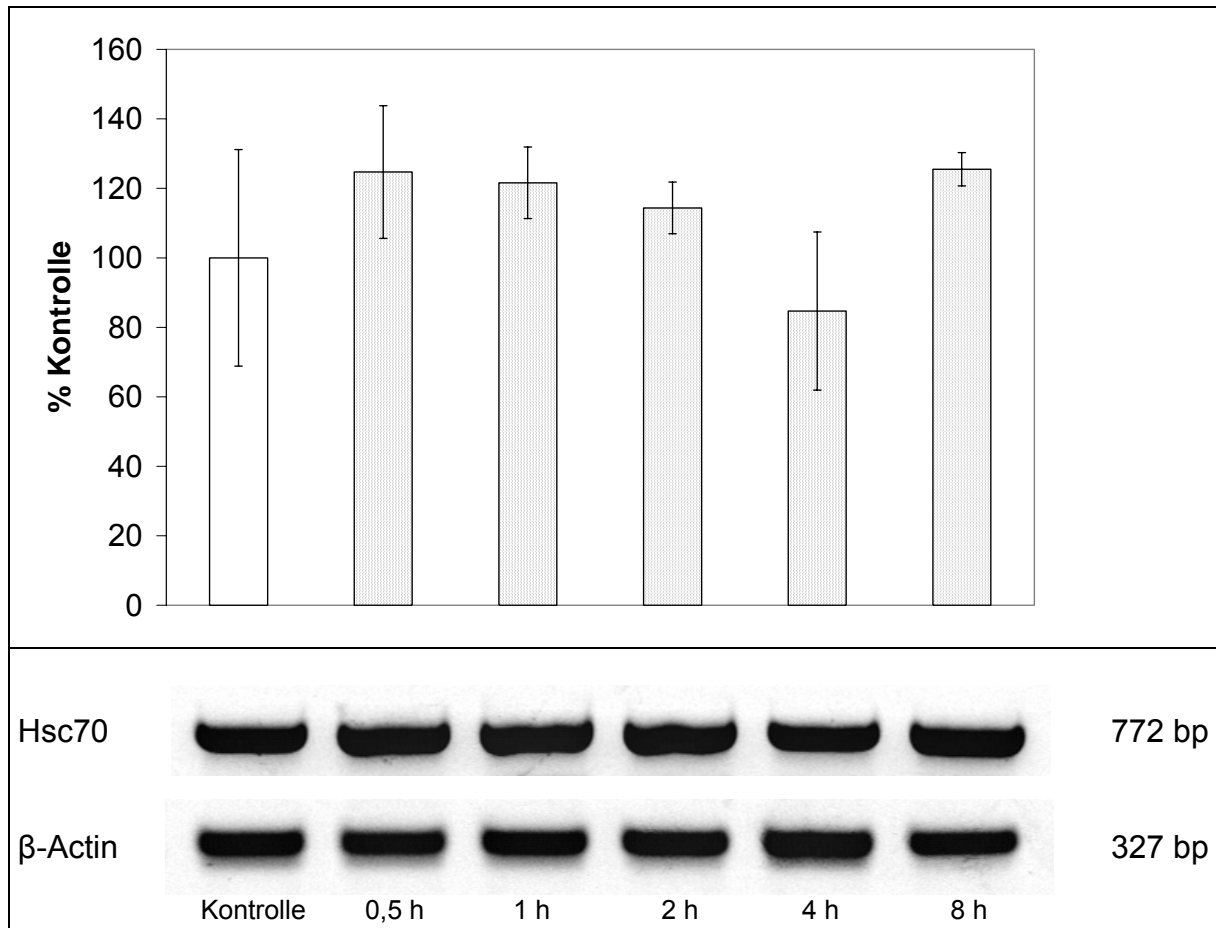


Abb. 3.49: Bestimmung der Expression der mRNA von Hsc70 mittels RT-PCR nach Behandlung der Neuroblastom-Zelllinie KELLY mit 500 μ M Flufenaminsäure über 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 8 h. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung der Banden. Dargestellt ist der Mittelwert des Hsc70-Signals \pm SD (n = 3) im Verhältnis zur β -Actin-Kontrolle. Dabei wurde der Mittelwert des Hsc70-Signals der unbehandelten Kontroll-Gruppe auf 100 % gesetzt. Für die verschiedenen Behandlungszeiten waren keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Kontroll-Gruppe auszumachen.

Unter der Behandlung der Neuroblastomzellen mit dem NSAR Flufenaminsäure wurde auf Protein-Ebene also Hsc70 deutlich hoch reguliert, während die verschiedenen detektierten Varianten oder Isoformen von Hsc70/54 allesamt herunter reguliert wurden. Diese Ergebnisse korrelierten jedoch nicht mit der Expression der Hsc70 bzw. Hsc54-mRNA, so dass davon auszugehen ist, dass keine transkriptionale Regulation zugrunde liegt.

3.6.3.2. Enolase-1, alpha (Eno-1)

Die Intensität des Protein-Spots, der als Enolase-1, alpha (Eno-1) identifiziert wurde, nahm nach einer Behandlung der Neuroblastomzellen mit Flufenaminsäure über 12 h statistisch signifikant auf wenig unter 20 % der Intensität der Kontrolle ab ($p \leq 0,01$).

Die Proteomanalysen der Zellen, die über kürzere Zeiträume von 3 h, 6 h und 9 h mit Flufenaminsäure behandelt wurden, zeigten für die Intensität des Eno-1-Protein-Spots keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Zwar lagen für jeden Zeitpunkt die mittleren Intensitäten deutlich unter denen der Kontrolle, aber da über die Zeit kein Trend erkennbar war, konnte keine Aussage darüber getroffen werden, wann der nach 12 h beobachtete Effekt eintrat. Trotz der mangelnden Signifikanz kann man aber davon ausgehen, dass dieser als Eno-1 identifizierte Protein-Spot schon früher reguliert wird, als erst nach 12 h Behandlungszeit (Abb. 3.50).

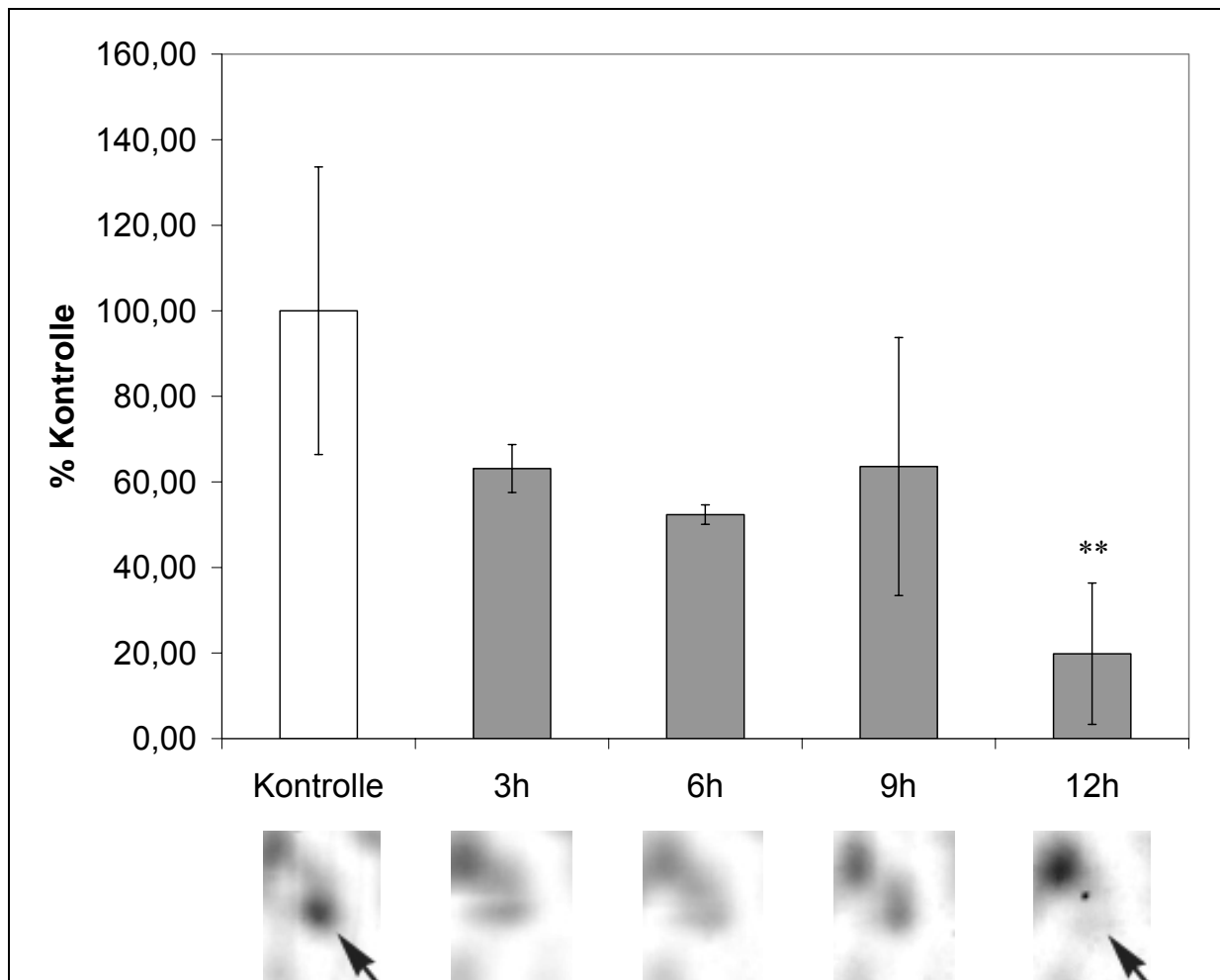


Abb. 3.50: Die mittlere Intensität des durch 2D-SDS-PAGE aufgetrennten Eno-1-Protein-Spots nach Behandlung der Neuroblastomzellen mit 500 µM Flufenaminsäure über 3 h, 6 h, 9 h und 12 h. Das Säulendiagramm gibt, bezogen auf die unbehandelten Kontroll-Proben, die densitometrische Auswertung der mit Silber gefärbten Spots in Prozent \pm SD an. Die zwei Sterne bezeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontroll-Gruppe (** : $p \leq 0,01$).

Der Eno-1-Protein-Spot wurde jedoch nicht bei einem Molekulargewicht von 47 kDa detektiert, wie es in der Literatur beschrieben wird, sondern bei ca. 37 kDa. In diesem Zusammenhang war das Ergebnis der MALDI-TOF-Analyse auffällig, weil die durch Trypsin-Spaltung erhaltenen Peptide, durch die der Protein-Spot als Eno-1 identifiziert wurde, N-terminal über ca. zwei Drittel der Aminosäuresequenz von Eno-1 verteilt waren, während C-terminal über eine Sequenz von 165 Aminosäuren kein Peptid von Eno-1 analysiert werden konnte (Abb. 3.51). Die Vermutung liegt daher nahe, dass das durch Flufenaminsäure regulierte Protein eine C-terminal verkürzte Isoform von Eno-1 ist.

N-Terminus	
1	MSILKIHARE IFDSRGNPTV EVDLFTSKGL FRAAVPSGAS TGIYEALRLR DNDKTRYMGK
61	GVSKAVEHIN KTIAPALVSK KLVNTEQEKI DKLMIEMDGT ENKSKFGANA ILGVSLAVCK
121	AGAVEKGVPL YRHIADLAGN SEVILPVPF NVINGGSHAG NKLAMQEFMI LPVGAANFRE
181	AMRIGAEVYH NLKNVIKEY GKDATNVGDE GGFAPNILEN KEGLELLKTA IGKAGYTDKV
241	VIGMDVAASE FFRSGKYDLD FKSPDDPSRY ISPDQLADLY KSFIDYPVV SIEDPFDQDD
301	WGAWQKFTAS AGIQVVGDDL TVTNPKRIAK AVNEKSCNCL LLKVNQIGSV TESLQACKLA
361	QANGWGVMS HRSGETEDTF IADLVVGLCT GQIKTGAPCR SERLAKYNQL LRIIEELGSK
421	AKFAGRNFNRN PLAK
C-Terminus	

Abb. 3.51: Aminosäuresequenz von Eno-1. Die grau hinterlegten Aminosäuresequenzen bezeichnen die nach tryptischen Verdau durch MALDI-TOF-Analysen identifizierten Protein-Fragmente von Eno-1.

Für die folgenden Western-Blot-Analysen wurde ein polyklonaler Antikörper gegen ein Peptid nahe dem C-Terminus von Eno-1 eingesetzt. Dieser Antikörper zeigte auch Aktivität gegenüber den beiden anderen bekannten Isoformen der Enolase, Enolase-2 (gamma) und Enolase-3 (beta) (Rydziel S, et al., 2004).

Bei mehreren zweidimensionalen Western-Blot-Analysen war mit diesem Antikörper an der entsprechenden Position kein Signal zu beobachten, was ebenfalls als Hinweis auf eine C-terminal verkürzte Eno-1-Isoform gewertet werden kann.

So war auch bei der eindimensionalen klassischen Western-Blot-Analyse bei 37 kDa keine Eno-1-Bande zu beobachten. Jedoch war, wie zu erwarten, bei ca. 47 kDa ein deutliches Signal für Enolase zu detektieren, wodurch gezeigt werden konnte, dass neben der durch MALDI-TOF identifizierten 37 kDa Eno-1-Isoform auch die bereits häufig beschriebene 47 kDa Enolase in den Neuroblastomzellen exprimiert wird. Interessanterweise war zu beobachten, dass auch die 47 kDa Enolase durch die 12-stündige Behandlung mit Flufenaminsäure statistisch signifikant ($p \leq 0,05$) auf knapp 60 % der Kontrolle herunter reguliert wurde (Abb. 3.52).

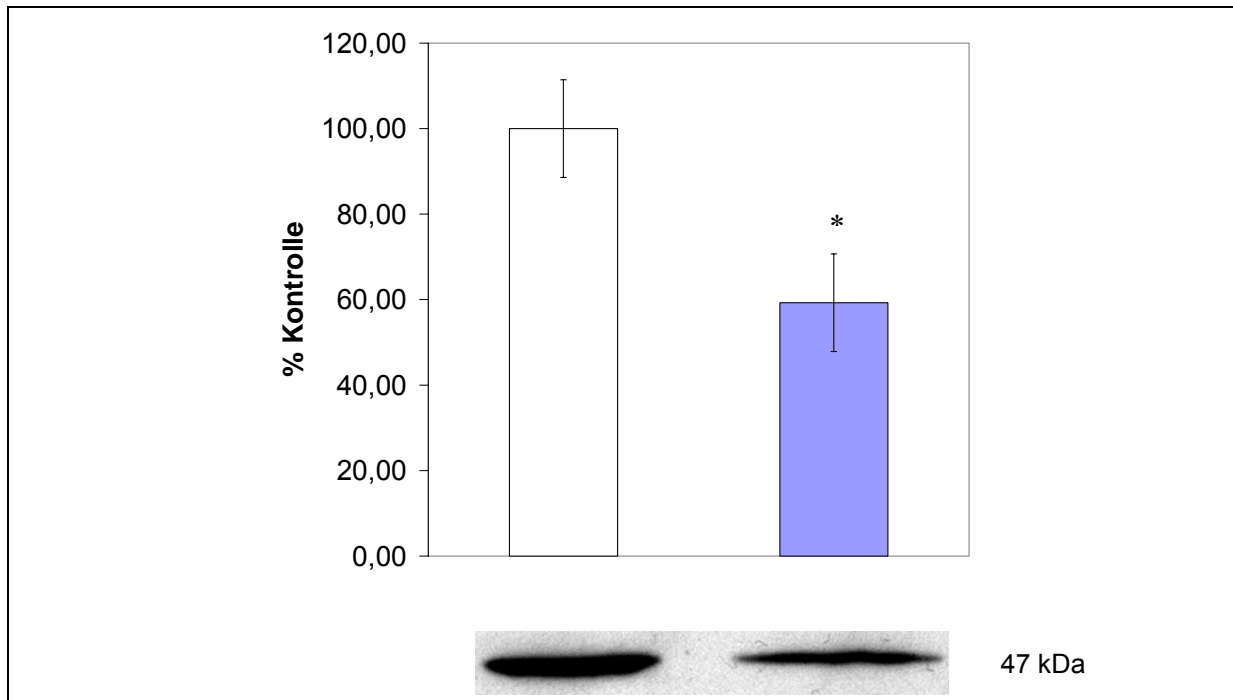


Abb. 3.52: Eindimensionale Western-Blot-Analyse von Enolase mit Neuroblastomzellen nach 12-stündiger Behandlung mit 500 µM Flufenaminsäure. Der eingesetzte Antikörper reagiert sowohl mit Eno-1, alpha, als auch mit den Isoformen Eno-2 und -3, gamma und beta. Dargestellt ist die mittlere Intensität des Enolase-Signals \pm SD ($n = 3$). Dabei wurde die mittlere Intensität der Kontrolle auf 100 % gesetzt. Der Stern bezeichnet einen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrolle ($p \leq 0,05$). Während im 2D-Gel der Eno-1-Spot bei ca. 37 kDa lag, war im 1D-Gel wie zu erwarten nur bei 47 kDa ein Signal für Enolase zu detektieren.

Um zu untersuchen, ob die beobachteten Veränderungen für Eno-1 auf Proteinebene über eine Veränderung der Expression der mRNA von Eno-1 reguliert werden, wurde eine semiquantitative RT-PCR durchgeführt. Es wurden Primer eingesetzt, durch die ein PCR-Produkt von 67 bp amplifiziert wurde (Scharte M, et al., 2003).

Über den gesamten Behandlungszeitraum der Neuroblastomzellen mit 500 µM Flufenaminsäure war keine statistisch signifikante Änderung der mRNA-Expression von Eno-1 festzustellen (Abb. 3.53). Es ist daher davon auszugehen, dass die Regulation von Eno-1 (37 kDa und 47 kDa) durch die Behandlung mit Flufenaminsäure nicht auf der Ebene der Transkription stattfindet. Zu diskutieren und weiter zu untersuchen wäre daher eine translationale und/oder post-translationale Regulation von Eno-1 und ihren Isoformen.

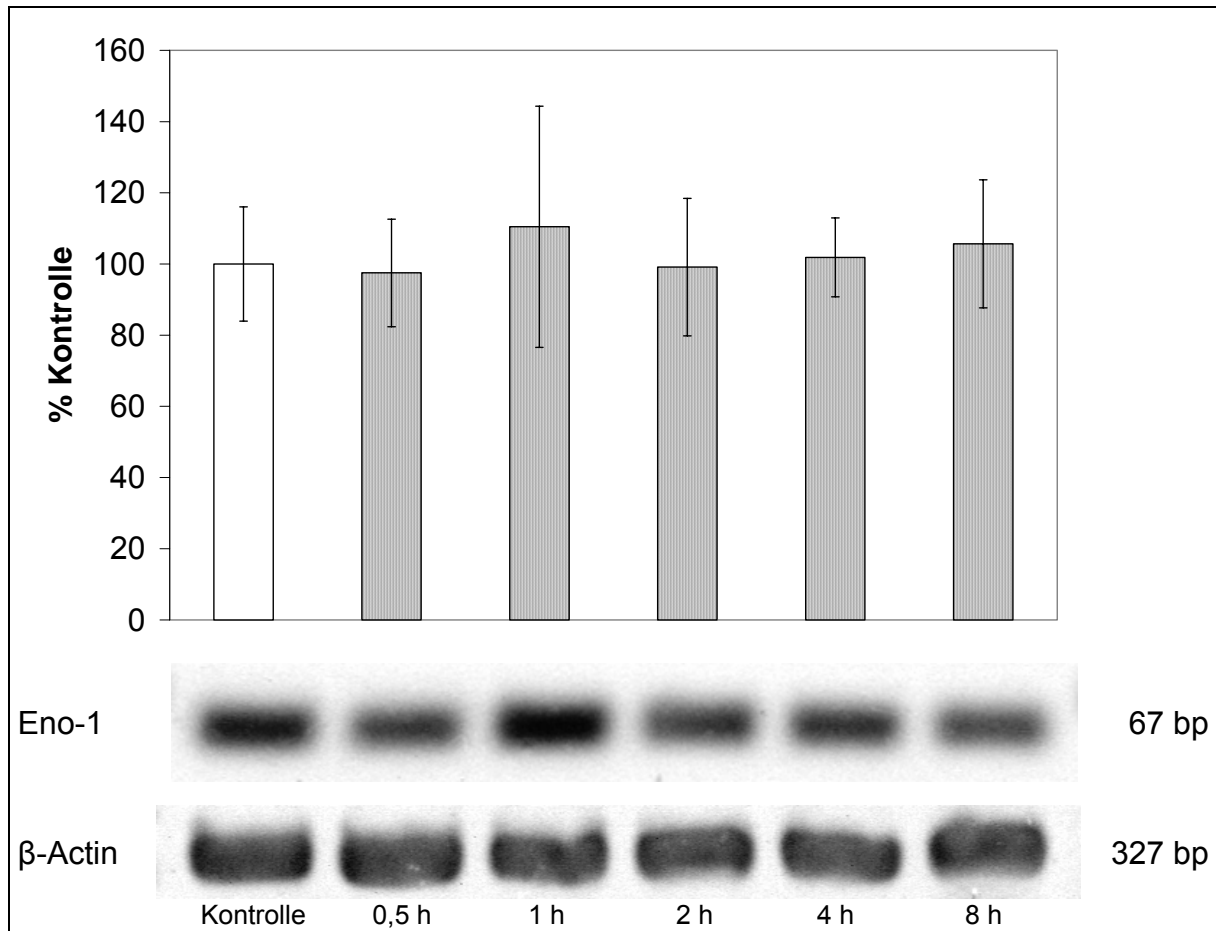


Abb. 3.53: Bestimmung der Expression der mRNA von Eno-1 mittels RT-PCR nach Behandlung der Neuroblastom-Zelllinie KELLY mit 500 μ M Flufenaminsäure über 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 8 h. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung der Banden. Dargestellt ist der Mittelwert des Eno-1-Signals \pm SD ($n = 3$) im Verhältnis zur β -Actin-Kontrolle. Dabei wurde der Mittelwert des Eno-1-Signals der unbehandelten Kontroll-Gruppe als 100 % definiert. Über die gesamte Behandlungszeit war keine statistisch signifikante Veränderung der mRNA-Expression von Eno-1 feststellbar.

3.6.3.3. T-Complex protein 1, epsilon (TCP-1 ϵ)

Die mittlere Intensität des Protein-Spots, der als T-Complex protein 1, epsilon (TCP-1 ϵ) identifiziert wurde, nahm nach einer Behandlung der Neuroblastomzellen mit 500 μ M Flufenaminsäure über 12 h auf gut 25 % der Kontrolle ab. Aufgrund der hohen Standardabweichung der Kontroll-Gruppe war das Ergebnis statistisch nur schwach signifikant ($p \leq 0,05$).

Nach 3 h, 6 h und 9 h Flufenaminsäure-Behandlung waren die mittleren Intensitäten der TCP-1 ϵ -Protein-Spots um ungefähr 30 % auf ähnlichem Niveau wie nach 12 h. Diese Ergebnisse waren jedoch wegen der geringen Stichproben und der hohen Standardabweichung der Kontroll-Gruppe statistisch nicht signifikant. Dennoch liegt die Vermutung nahe, dass TCP-1 ϵ schon früh nach der Applikation des NSAR herunter reguliert wurde (Abb. 3.54).

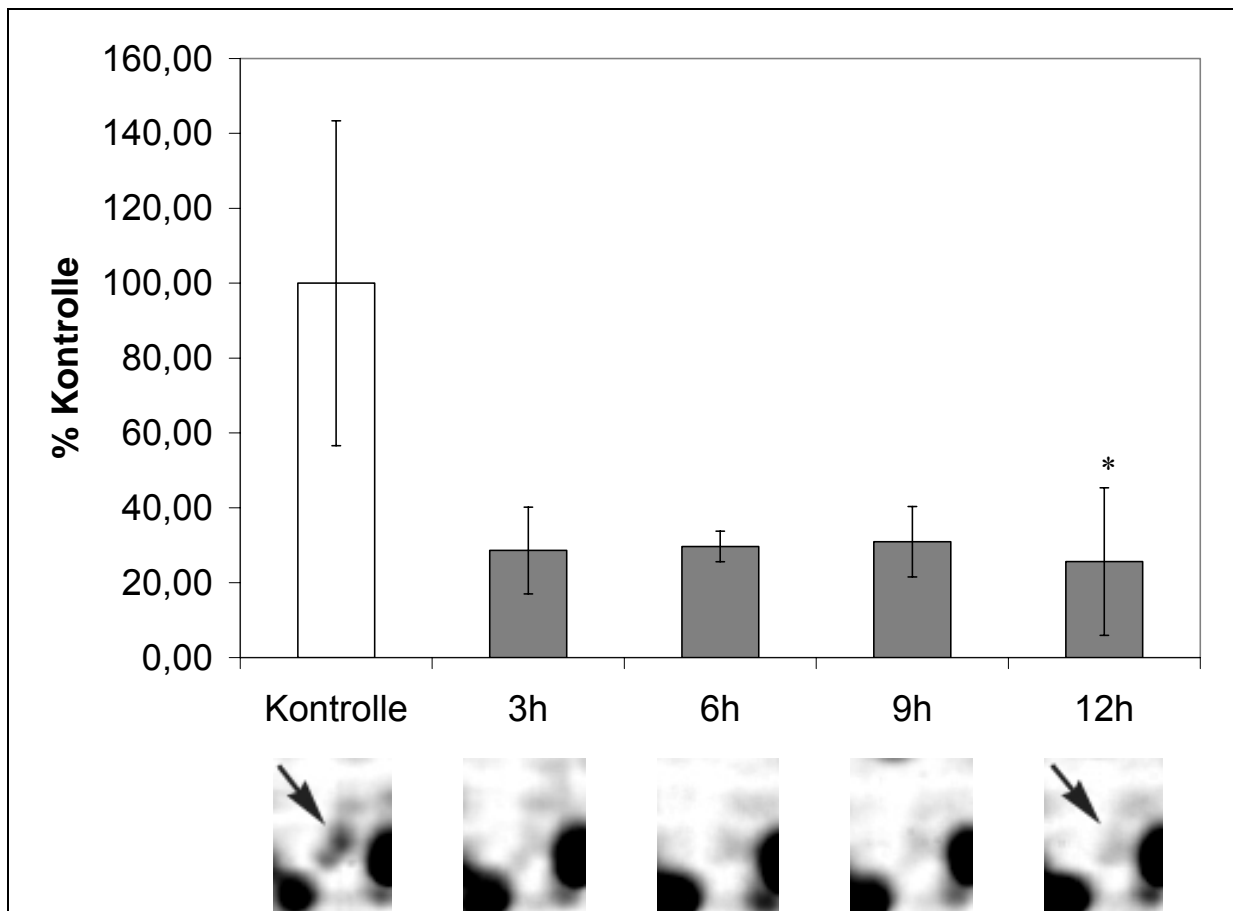


Abb. 3.54: Mittlere Intensität des durch 2D-SDS-PAGE aufgetrennten TCP-1 ϵ -Protein-Spots nach Behandlung von Neuroblastomzellen mit 500 μ M Flufenaminsäure über 3 h, 6 h, 9 h und 12 h. Das Säulendiagramm gibt, bezogen auf die unbehandelten Kontroll-Proben, die densitometrische Auswertung der mit Silber gefärbten Spots in Prozent \pm SD an. Die Sterne bezeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontroll-Gruppe (* : $p \leq 0,05$).

Das identifizierte Protein TCP-1 ϵ ist eine Komponente des Heterooligo-Protein-Komplexes CCT (Chaperonin-containing TCP-1), der aus sechs bis neun unterschiedlichen Untereinheiten (alpha, beta, gamma, delta, epsilon, zeta, eta und theta) besteht, die von verschiedenen Genen kodiert werden (Kubota H, et al., 1994).

Um zu untersuchen, ob sich die negative Regulation von TCP-1 ϵ durch Flufenaminsäure auf Proteinebene auch in der mRNA-Expression widerspiegelt, wurde mittels semiquantitativer RT-PCR die mRNA-Expression von TCP-1 ϵ analysiert. Dafür wurden Primer eingesetzt, durch die ein 230 bp langer DNA-Abschnitt der TCP-1 ϵ -cDNA amplifiziert werden konnte. Über die gesamte Zeit der Behandlung mit 500 μ M Flufenaminsäure war weder nach 30 min, noch nach 1 h, 2 h, 4 h oder 8 h eine statistisch signifikante Änderung der TCP-1 ϵ -mRNA-Expression zu beobachten (Abb. 3.55).

Die Änderungen von TCP-1 ϵ auf Protein-Ebene scheinen also nicht auf eine verminderte Transkription zurückzuführen sein.

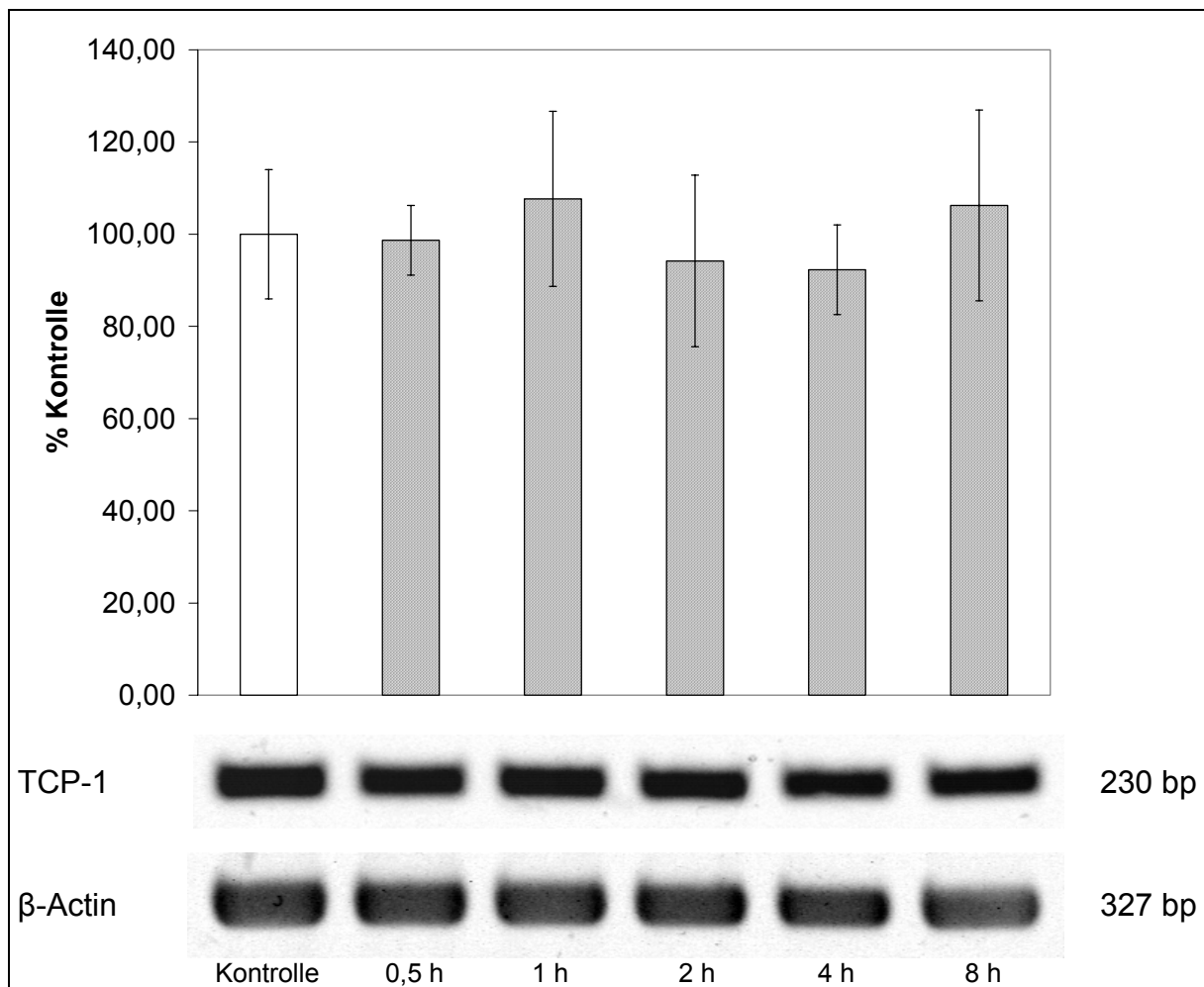


Abb. 3.55: Bestimmung der Expression der mRNA von TCP-1 ϵ mittels RT-PCR nach Behandlung der Neuroblastom-Zelllinie KELLY mit 500 μ M Flufenaminsäure über 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 8 h. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung der Banden. Dargestellt ist der Mittelwert des TCP-1 ϵ -Signals \pm SD (n = 3) im Verhältnis zur β -Actin-Kontrolle. Der Mittelwert des TCP-1 ϵ -Signals der unbehandelten Kontroll-Gruppe wurde auf 100 % gesetzt. Für keine Behandlungszeit war ein statistisch signifikanter Unterschied zur Kontroll-Gruppe zu beobachten.

3.6.3.4. Pyruvat-Kinase, Isoform M1 oder M2 (PK-M1/M2)

Ein weiteres Protein, das bei der Proteomanalyse nach 12-stündiger Behandlungszeit der Neuroblastomzellen deutlich und statistisch signifikant herunter reguliert wurde, ist mittels MALDI-TOF-Analyse als Pyruvat-Kinase, Isoform M1 oder M2 identifiziert worden, da die analysierten Proteinfragmente zu beiden Isoformen, die sich nur auf der C-terminalen Seite leicht unterscheiden, gehören konnten (Abb. 3.57). Die Intensität des PK-M1/M2-Protein-Spots nahm auf knapp unter 30 % ab ($p \leq 0,001$).

Nach den Ergebnissen der Proteomanalysen der kürzer behandelten Zellen zu urteilen, scheint die Regulation von PK-M1/M2 schon früh in den ersten 6 h nach Applikation zu beginnen. So fand sich nach 3 h Behandlungszeit für PK-M1/M2 noch eine Intensität von gut 55 % der Kontrolle, während nach 6 h und 9 h die Spot-Intensität wie auch nach 12 h bei knapp unter 30 % lag (Abb. 3.56). Diese Ergebnisse waren ebenfalls statistisch signifikant ($p \leq 0,01$).

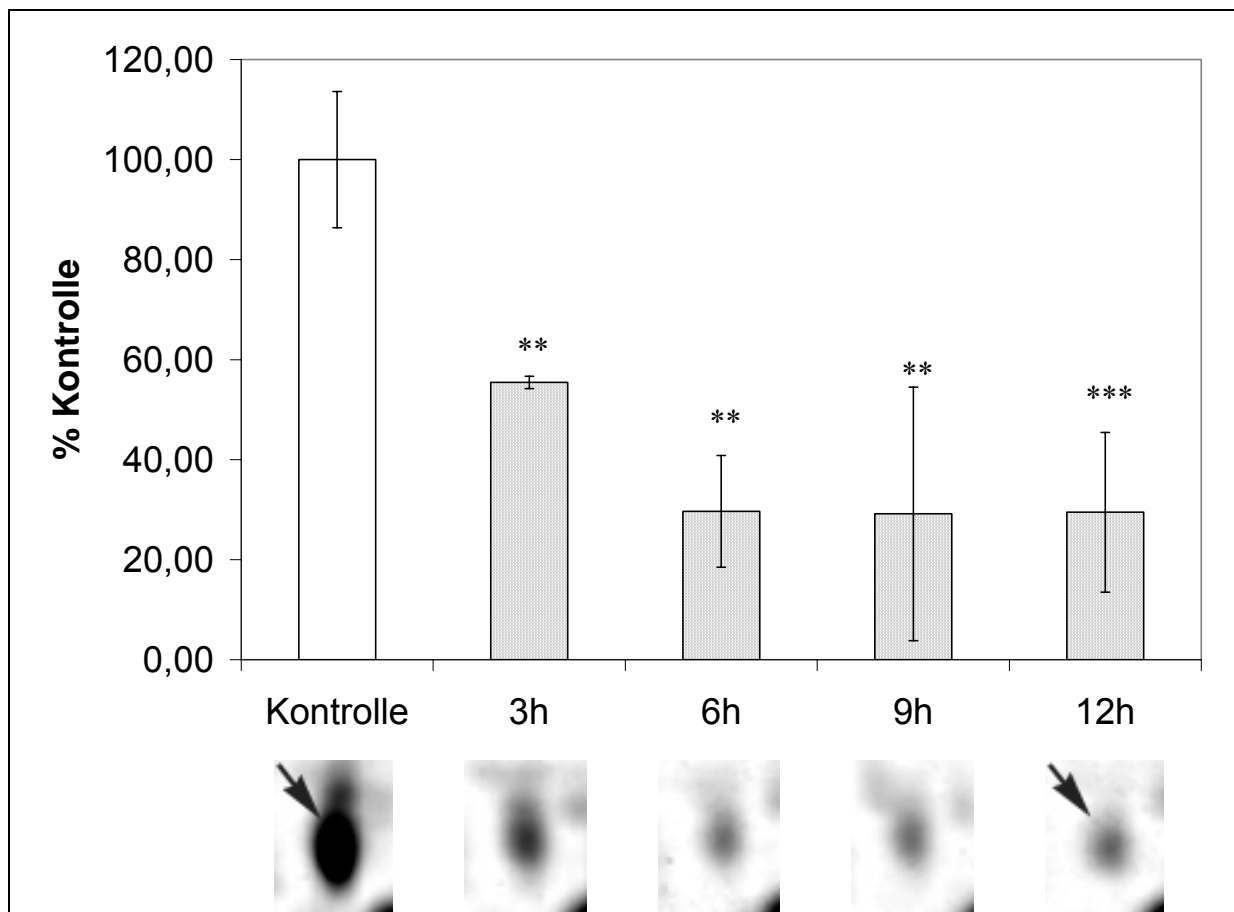


Abb. 3.56: Die mittlere Intensität des durch 2D-SDS-PAGE aufgetrennten PK-M1/M2-Protein-Spots nach Behandlung der Neuroblastomzellen mit 500 μ M Flufenaminsäure über 3 h, 6 h, 9 h und 12 h. Das Säulendiagramm gibt, bezogen auf die unbehandelten Kontroll-Proben, die densitometrische Auswertung der mit Silber gefärbten Spots in Prozent \pm SD wieder. Die Sterne bezeichnen statistisch signifikante Unterschiede zur Kontroll-Gruppe (** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$).

Das Molekulargewicht des PK-M1/M2-Spots im 2D-Gel stimmt jedoch nicht mit den MW-Daten aus der Literatur überein. Der PK-M1/M2-Spot lag im 2D-Gel bei ca. 38 kDa und war damit ungefähr 20 kDa leichter. Dieses als PK-M1/M2 identifizierte Protein scheint also um eine bestimmte Aminosäuresequenz verkürzt zu sein.

Das Ergebnis der MALDI-TOF-Analyse legt die Annahme nahe, dass PK-M1/M2 in der vorliegenden Form am C-terminalen Ende verkürzt ist, da die identifizierten Protein-Fragmente N-terminal nur über ungefähr zwei Drittel der gesamten Aminosäuresequenz verteilt sind (Abb. 3.57). Aus der Gegenüberstellung der beiden Aminosäuresequenzen von PK-M1 und PK-M2 wird deutlich, dass die sich unterscheidenden Aminosäuren und Sequenzen in dem Bereich liegen, aus dem kein Protein-Fragment analysiert wurde. Das heißt, dass die Möglichkeit besteht, dass die analysierte Isoform keinen Abschnitt aufweist, der eine Unterscheidung zwischen einer Isoform von PK-M1 oder PK-M2 ermöglichen würde.

N-Terminus	
PK-M1	1 MSKPHSEAGT AFIQTQQLHA AMADTFLEHM CRLDIDSPPI TARNTGICT IGPASRSVET
PK-M2	1 MSKPHSEAGT AFIQTQQLHA AMADTFLEHM CRLDIDSPPI TARNTGICT IGPASRSVET
PK-M1	61 LKEMIKSGMN VARLNFSHGT HEYHAETIKN VRTATESFAS DPILYRPVAV ALDTKGPEIR
PK-M2	61 LKEMIKSGMN VARLNFSHGT HEYHAETIKN VRTATESFAS DPILYRPVAV ALDTKGPEIR
PK-M1	121 TGLIKSGSTA EVELKKGATL KITLDNAYME KCDENILWLD YKNICKVVEV GSKIYVDDGL
PK-M2	121 TGLIKSGSTA EVELKKGATL KITLDNAYME KCDENILWLD YKNICKVVEV GSKIYVDDGL
PK-M1	181 ISLQVKQKGA DFLVTEVENG GSLGSKKGVN LPGAAVDLPA VSEKDIQDLK FGVEQDVDMV
PK-M2	181 ISLQVKQKGA DFLVTEVENG GSLGSKKGVN LPGAAVDLPA VSEKDIQDLK FGVEQDVDMV
PK-M1	241 FASFIRKASD VHEVRKVLGE KGKNIKIISK IENHEGVRRF DEILEASDGI MVARGDGLIE
PK-M2	241 FASFIRKASD VHEVRKVLGE KGKNIKIISK IENHEGVRRF DEILEASDGI MVARGDGLIE
PK-M1	301 IPAQKVFLLAQ KMMIGRCNRA GKPVICATQM LESMIKKPP TRAEGSDVAN AVLGDADCIM
PK-M2	301 IPAQKVFLLAQ KMMIGRCNRA GKPVICATQM LESMIKKPP TRAEGSDVAN AVLGDADCIM
PK-M1	361 LSGETAKGDY PLEAVRMQHL IAREAEAAAMF HRKLFEELRR ASSHSTDLME AMAMGVEAS
PK-M2	361 LSGETAKGDY PLEAVRMQNL IAREAEAAAMF HRKLFEELRR LAPITSDPTE AAVGAVEAS
PK-M1	421 YKCLAAALIV LTESGRSAHQ VARYRPRAPI IAVTRNPQTA RQAHLYRGIF PVLCKDPVQE
PK-M2	421 YKCCSCAIV LTKGRSAHQ VARYRPRAPI IAVTRNPQTA RQAHLYRGIF PVLCKDPVQE
PK-M1	481 AWAEDVDLRV NFAMNVGKAR GFFKKGDVVI VLTGWRPGSG FTNTMRVVPV P
PK-M2	481 AWAEDVDLRV NFAMNVGKAR GFFKKGDVVI VLTGWRPGSG FTNTMRVVPV P
C-Terminus	

Abb. 3.57: Aminosäuresequenz von PK-M1 und PK-M2. Die grau hinterlegten Sequenzen bezeichnen die nach Verdau mit Trypsin durch MALDI-TOF-Analysen identifizierten PK-M1/M2-Protein-Fragmente. Die Unterschiede der beiden Isoformen in der C-terminalen Hälfte sind rot hinterlegt. Aus diesem Bereich wurde kein Protein-Fragment identifiziert.

PK-M2 gilt als tumorspezifische Pyruvat-Kinase-Isoform, weil sie während der Tumorgenese verstärkt exprimiert wird, während andere gewebespezifischen Isoformen verschwinden (Yamada K, Noguchi T, 1995). Daher wurde angenommen, dass die vorliegende PK-Isoform in der M2-Isoform ihren Ursprung hat. Mittels semiquantitativer RT-PCR wurde untersucht, ob die Expression der PK-M2-mRNA durch die Behandlung mit Flufenaminsäure reguliert wird. Die Zellen der Neuroblastom-Zelllinie KELLY wurden dafür über 8 Stunden mit 500 µM Flufenaminsäure behandelt. Aus dem Lysat der Zellen war eine starke Expression von PK-M2-mRNA nachweisbar, jedoch war weder nach 30 min, noch nach 1 h, 2 h, 4 h oder 8 h eine statistisch signifikante Veränderung der mRNA-Expression gegenüber den Kontroll-Proben zu beobachten (Abb. 3.58).

Es bleibt daher weiter zu untersuchen, ob die identifizierte ca. 38 kDa schwere PK-Isoform durch alternative Transkription und/oder durch post-translationale Prozessierungen und Modifikationen entsteht bzw. reguliert wird.

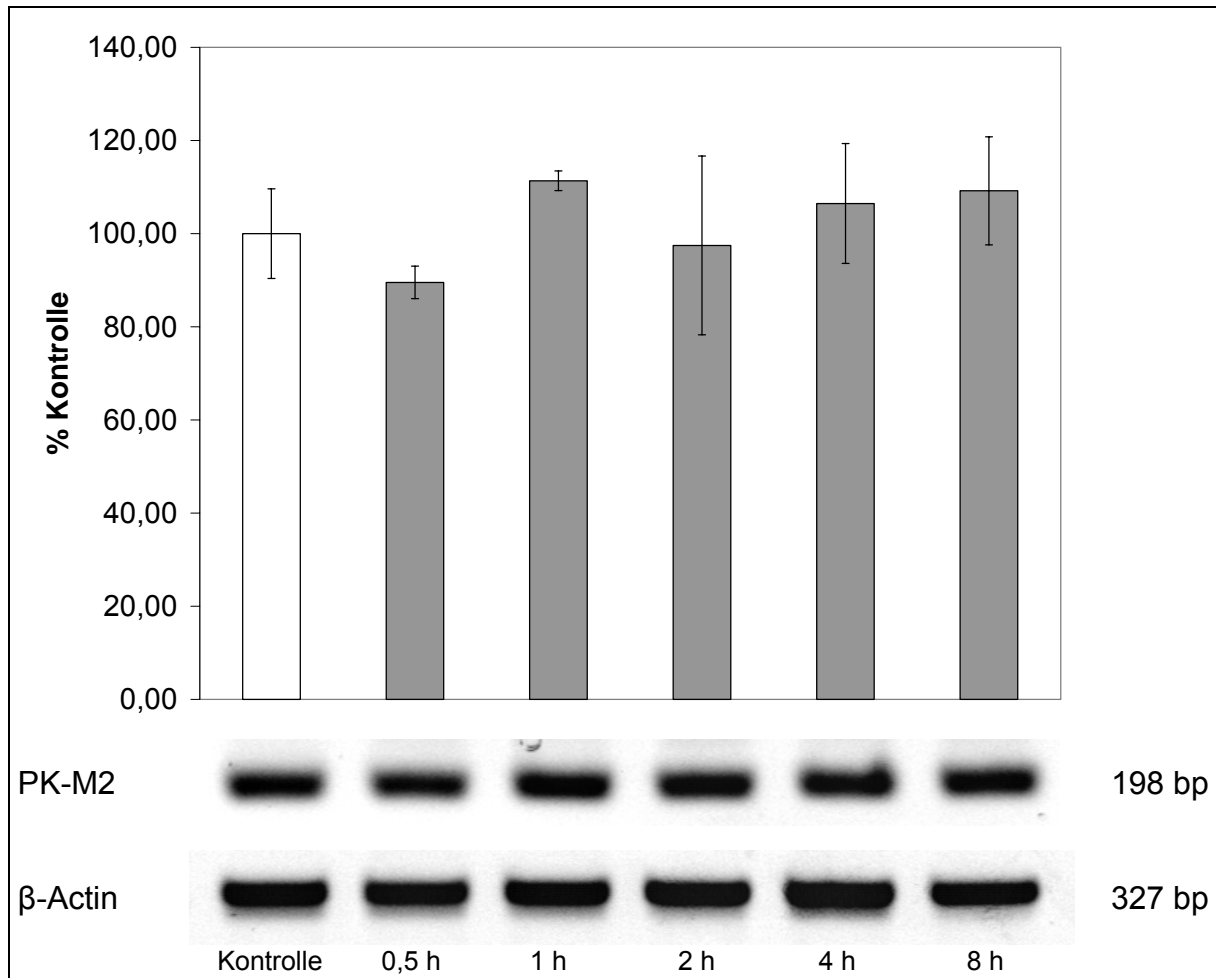


Abb. 3.58: Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung der Bestimmung der Expression der mRNA von PK-M2 mittels RT-PCR nach Behandlung der Neuroblastom-Zelllinie KELLY mit 500 µM Flufenaminsäure über 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 8 h. Dargestellt ist der Mittelwert des PK-M2-Signals \pm SD ($n = 3$) im Verhältnis zur β -Actin-Kontrolle. Dabei wurde der Mittelwert des PK-M2-Signals der unbehandelten Kontroll-Gruppe auf 100 % gesetzt. Für die verschiedenen Behandlungszeiten waren keine statistisch signifikanten Unterschiede zur Kontroll-Gruppe festzustellen.

3.6.3.5. Eukaryotischer Elongationsfaktor 2 (eEF2)

Die Proteomanalyse der über 12 h mit Flufenaminsäure (500 μ M) behandelten Neuroblastomzellen ergab auch für den eukaryotischen Elongationsfaktor 2 (eEF2) ein statistisch signifikantes Ergebnis. Die mittlere Intensität des Protein-Spots, der durch MALDI-TOF als eEF2 identifiziert wurde, sank auf unter 5 %, bezogen auf die mittlere Intensität der Kontroll-Gruppe ($p \leq 0,001$).

Auch die Ergebnisse der Proteomanalysen nach 3 h, 6 h und 9 h Behandlungszeit waren für eEF2 statistisch signifikant ($p \leq 0,05$ bzw. $p \leq 0,01$). Nach 3 h lag die mittlere Intensität des eEF2-Spots bei ca. 63 %. Nach 6 h war sie schon auf ungefähr 11 % gesunken. Daher kann man vermuten, dass eEF2 bereits in den ersten sechs Stunden nach Applikation des NSAR Flufenaminsäure reguliert wird (Abb. 3.59).

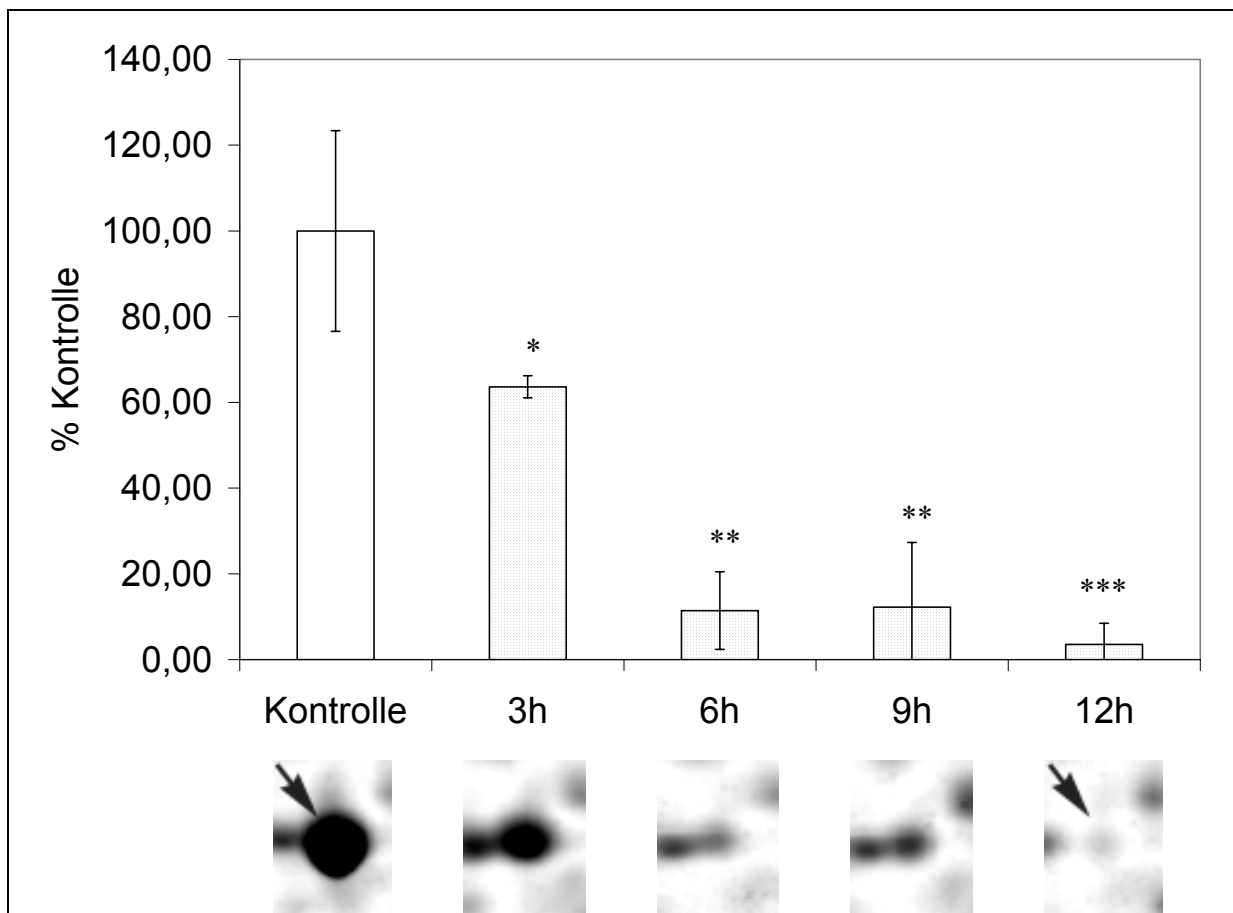


Abb. 3.59: Mittlere Intensität des Protein-Spots von eEF2 nach Behandlung von Neuroblastomzellen mit 500 μ M Flufenaminsäure über 3 h, 6 h, 9 h und 12 h. Das Säulendiagramm stellt die densitometrische Auswertung der eEF2-Spots der mit Silber gefärbten 2D-Gele dar. Die Angaben sind in Prozent \pm SD, bezogen auf die mittlere Intensität der Kontroll-Gruppe, die auf 100 % gesetzt wurde. Die Sterne bezeichnen statistisch signifikante Unterschiede zur Kontrolle (* : $p \leq 0,05$; ** : $p \leq 0,01$; *** : $p \leq 0,001$).

Anders als es die Daten aus der Literatur hätten erwarten lassen, lag der als eEF2 identifizierte Protein-Spot im 2D-Gel nicht bei ca. 94 kDa, sondern nur bei ca. 41 kDa. Wenn man sich dazu noch die Verteilung der durch MALDI-TOF analysierten Protein-Fragmente von eEF2 ansieht, die durch den Verdau mit Trypsin entstanden sind, so scheint der identifizierte eEF2-Spot um eine lange Aminosäuresequenz zwischen Arg330 und Lys833 verkürzt zu sein (Abb. 3.60). Damit lässt sich das geringere Molekulargewicht des herunter regulierten eEF2-Spots erklären. Es scheint sich um eine Isoform von eEF2 zu handeln, die um eine relativ lange Sequenz in der N-terminalen Hälfte des eEF2-Proteins verkürzt wurde.

N-Terminus	
1	MDKKANIRNM SVIAHVDHGK STLTDSLVC AGIIASARAG ETRFTDTRKD EQERCITIKS
61	TAISLFYELS ENDLNFIKQS KDGAGFLINL IDSPGHVDFS SEVTAALRV DGALVVVDCV
121	SGVVCQTETV LRQAIAERIK PVLMMNMMDR ALLELQLEPE ELYQTFQRIV ENVNVIISTY
181	GEGESGPMGN IMIDPVLGTV GFGSGLHGWA FTLKQFAEMY VAKFAAKGEG QLGPAERAKK
241	VEDMMKKLWG DRYFDPANGK FSKSATSPEG KKLPR TFCQL ILDPFKVFD AIMNFKKEET
301	AKLIEKLDIK LSEDKDKEG KPLLKAVMRR WLPAGDALLQ MITIHLPSPV TAQKYRCCELL
361	YEGPPDDEAA MGIKSCDPKG PLMMYISKMV PTSDKGRFYA FGRVFSGLVS TGLKVRIMGP
421	NYTPGKKEDL YLKPIQRTIL MMGRYVEPIE DVPCGNIVGL VGVDQFLVKT GTITTFEHAH
481	NMRVMKFSVS PVVRVAVEAK NPADLPKLVE GLKRLAKSDP MVQCIIIESG EHIIAGAGEL
541	HLEICLKDLE EDHACIPIKK SDPVVSYRET VSEESNVLCL SKSPNKHNL YMKARFPFDG
601	LAEDIDKGEV SARQELKQRA RYLAEKYEWV VAEARKIWCF GPDGTGPNIL TDITKGVQYL
661	NEIKDSVVAG FQWATKEGAL CEENMRGVRF DVHDTVTLHAD AIHRGGGQII PTARRCLYAS
721	VLTAQPRIME PIYLVEIQCP EQVVGGIYGV LNRKRGHVFE ESQVAGTPMF VVKAYLPVNE
781	SFGFTADLRS NTGGQAFQC VFDHWQILPG DPFDNSSRPS QVVAETRKRK GLKEGIPALD
841	NFLDKL
C-Terminus	

Abb. 3.60: Aminosäuresequenz von eEF2. Die grau hinterlegten Aminosäuresequenzen bezeichnen die nach tryptischem Verdau durch MALDI-TOF-Analysen identifizierten eEF2-Protein-Fragmente.

Im Abstand von ΔpI 0,1 zum Säuren verschoben und bei nahezu gleichem Molekulargewicht konnte außerdem ein Protein-Spot beobachtet werden, der fast parallel zur Abnahme des 41 kDa eEF2-Spots deutlich an Intensität zunahm (Abb. 3.61). Unter Verwendung des „Scansite Molecular Weight & Isoelectric Point Calculators“ (http://scansite.mit.edu/calc_mw_pi.html) konnte errechnet werden, dass sich der pI-Wert von eEF2 für jeden Phosphorylierungsschritt um ca. 0,1 zum Säuren verschiebt. Da zudem noch aus der Literatur bekannt ist, dass eEF2 durch Phosphorylierung an Thr56 bzw. Thr45 inaktiviert wird, könnte die Abnahme von 41 kDa eEF2 tatsächlich auf einer Phosphorylierungsreaktion beruhen (Ovchinnikov LP, et al., 1990; Price NT, et al., 1991; Ryazanov AG, Davydova EK, 1989; Redpath NT, et al., 1993). Der Beweis steht allerdings noch aus.

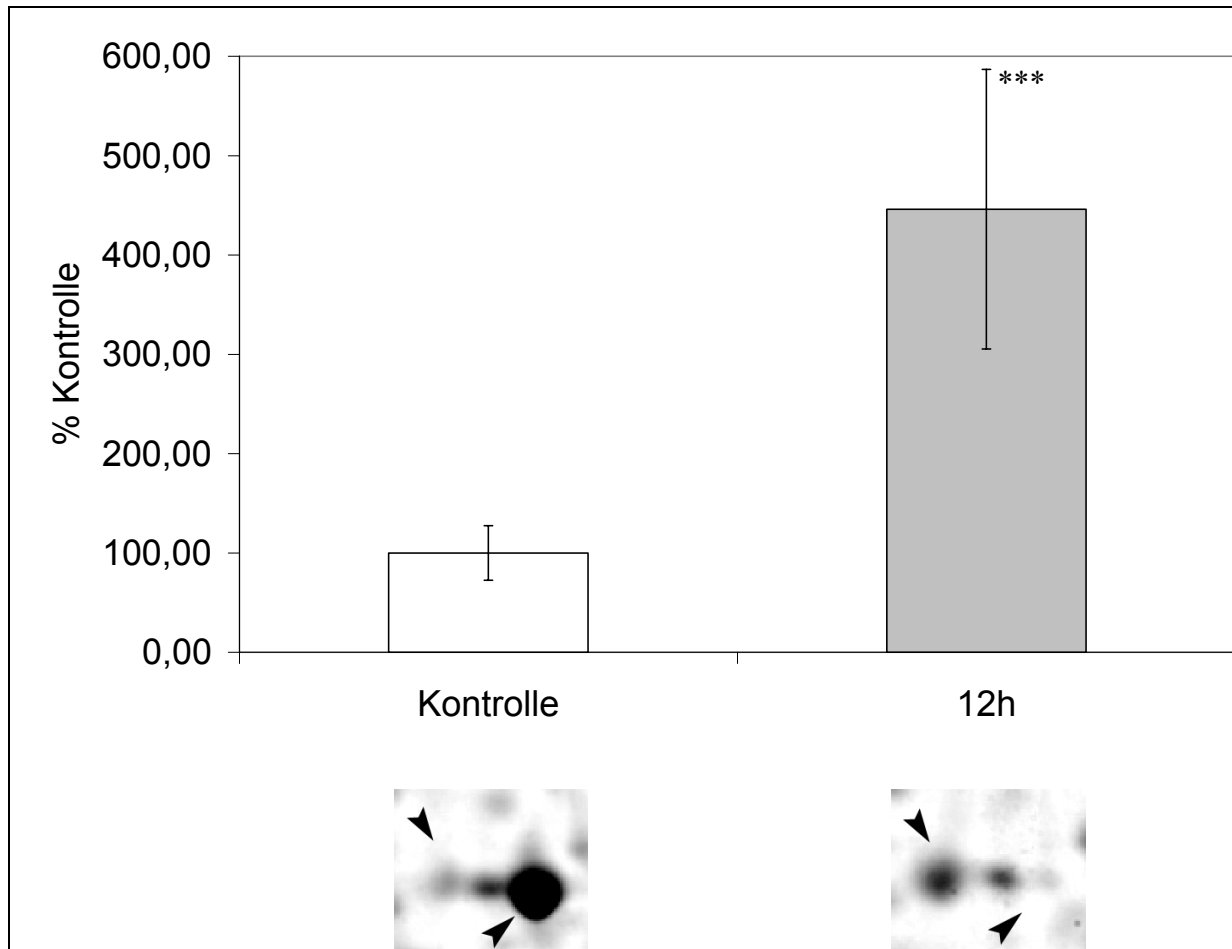


Abb. 3.61: Die beiden Pfeile kennzeichnen jeweils den Protein-Spot von 41 kDa eEF2 (rechter unterer Pfeil) und einen um ΔpI 0,1 zum Säuern verschobenen Protein-Spot (linker oberer Pfeil). Die gegenläufige Zu- bzw. Abnahme der zwei Protein-Spots durch Behandlung der Neuroblastomzellen mit dem NSAR Flufenaminsäure über 12 h und der Abstand von ΔpI 0,1 könnten auf eine Phosphorylierungsreaktion von 41 kDa eEF2 hindeuten. Das Säulendiagramm stellt die densitometrische Auswertung des linken Protein-Spots dar. Die Angaben sind in Prozent \pm SD, bezogen auf die mittlere Intensität der Kontrolle, die auf 100 % gesetzt wurde. Die drei Sterne bezeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontrolle ($p \leq 0,001$).

Bei der RT-PCR zur Untersuchung der eEF2-mRNA-Expression wurden Primer eingesetzt, durch die eine 227 bp lange DNA-Sequenz der eEF2-cDNA amplifiziert wurde. Über die gesamte Behandlungszeit der Neuroblastomzellen mit 500 μ M Flufenaminsäure war an keinem Messpunkt eine statistisch signifikante Änderung der eEF2-mRNA-Expression nachweisbar (Abb. 3.62).

Dieses Ergebnis bezieht sich zunächst nur auf die Expression von 94 kDa eEF2, da durch das Primerpaar ein cDNA-Abschnitt amplifiziert wurde, der für eine Proteinsequenz codiert, die bei der identifizierten 43 kDa schweren Isoform von eEF2 höchstwahrscheinlich fehlt. Es ist anzunehmen, dass diese Isoform durch alternatives Spleißen der eEF2-mRNA entsteht. Um das jedoch heraus zu bekommen, müsste zunächst genau ermittelt werden, welche Aminosäuresequenz fehlt. Dann müssten Primer entwickelt werden, die den für diese Sequenz codierenden cDNA-Abschnitt umschließen. Bei einer transkriptionalen Regulation durch alternatives Spleißen würden durch die RT-PCR zwei DNA-Sequenzen unterschiedlicher Länge amplifiziert.

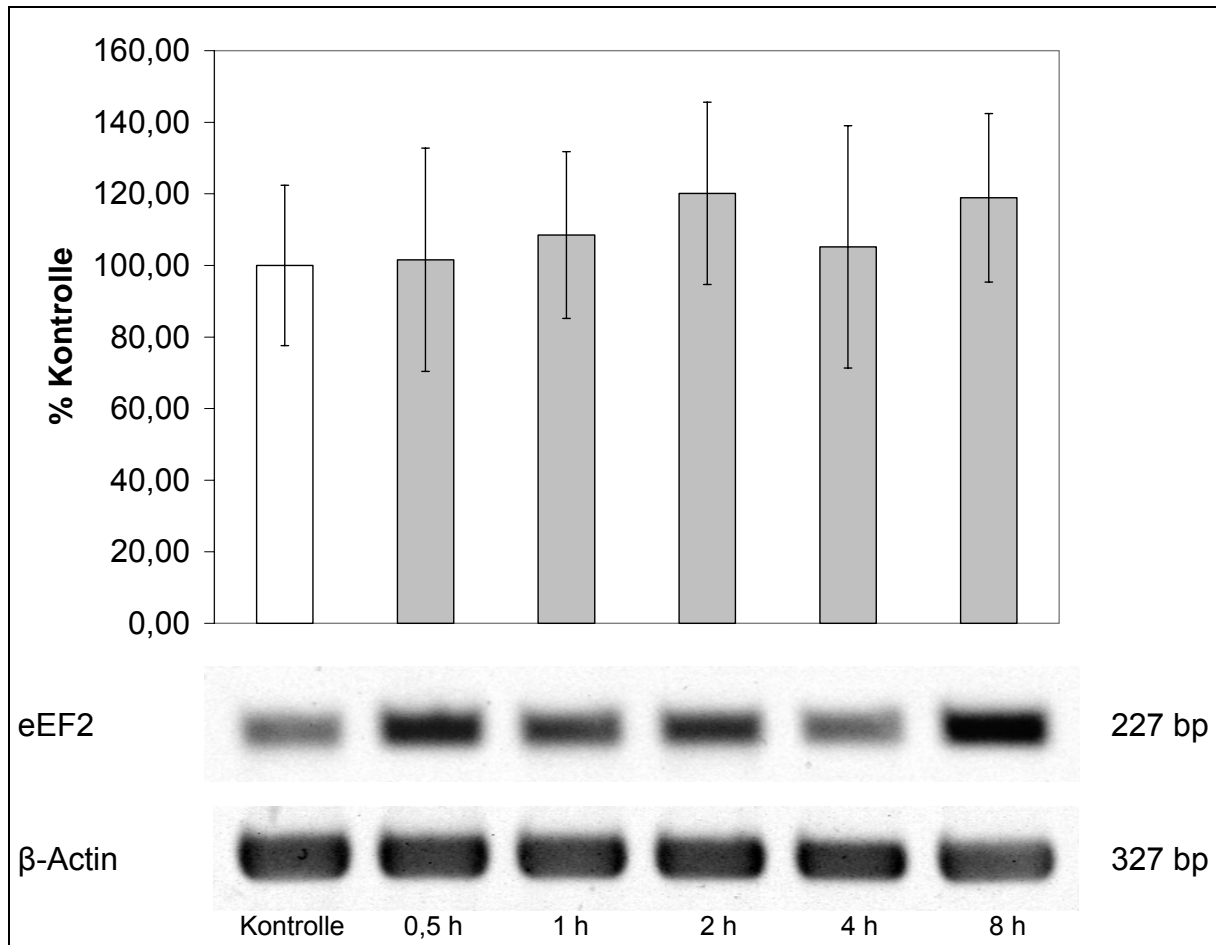


Abb. 3.62: Bestimmung der Expression der mRNA von eEF2 mittels RT-PCR nach Behandlung der Neuroblastom-Zelllinie KELLY mit 500 µM Flufenaminsäure über 30 min, 1 h, 2 h, 4 h und 8 h. Das Diagramm zeigt die densitometrische Auswertung der Banden. Dargestellt ist der Mittelwert des eEF2-Signals \pm SD ($n = 3$) im Verhältnis zur β -Actin-Kontrolle. Dabei wurde der Mittelwert des eEF2-Signals der unbehandelten Kontroll-Gruppe auf 100 % gesetzt. Es waren keine statistisch signifikanten Veränderungen auf der Ebene der mRNA von eEF2 zu beobachten.

3.6.3.6. Similar to Elongation factor 2b (sEF2b)

Bei der Proteomanalyse von Neuroblastomzellen, die mit 500 μ M Flufenaminsäure behandelt wurden, wurde ein weiterer Protein-Spot analysiert, der dem eukaryotischen Elongationsfaktor 2 (eEF2) sehr ähnlich ist und deshalb „Similar to Elongation factor 2b“ (sEF2b) genannt wird. Die mittlere Intensität dieses Spots ging über die Behandlungszeit von 12 h verglichen mit der Kontrolle auf etwas weniger als 12 % zurück. Das Ergebnis war statistisch signifikant ($p \leq 0,001$).

Auch die Ergebnisse der Proteomanalysen nach 3 h, 6 h und 9 h Behandlung mit dem NSAR Flufenaminsäure waren für das sEF2b-Protein statistisch signifikant ($p \leq 0,001$). Jedoch war der Verlauf der mittleren Intensitäten über die Zeit schwankend. So liegt die mittlere Intensität für sEF2b nach 3 h noch bei gut 31 %, nach 6 h schon nur noch bei 5 %, während nach 9 h wieder eine Intensität von knapp 19 % der Kontrolle gemessen wurde (Abb. 3.63).

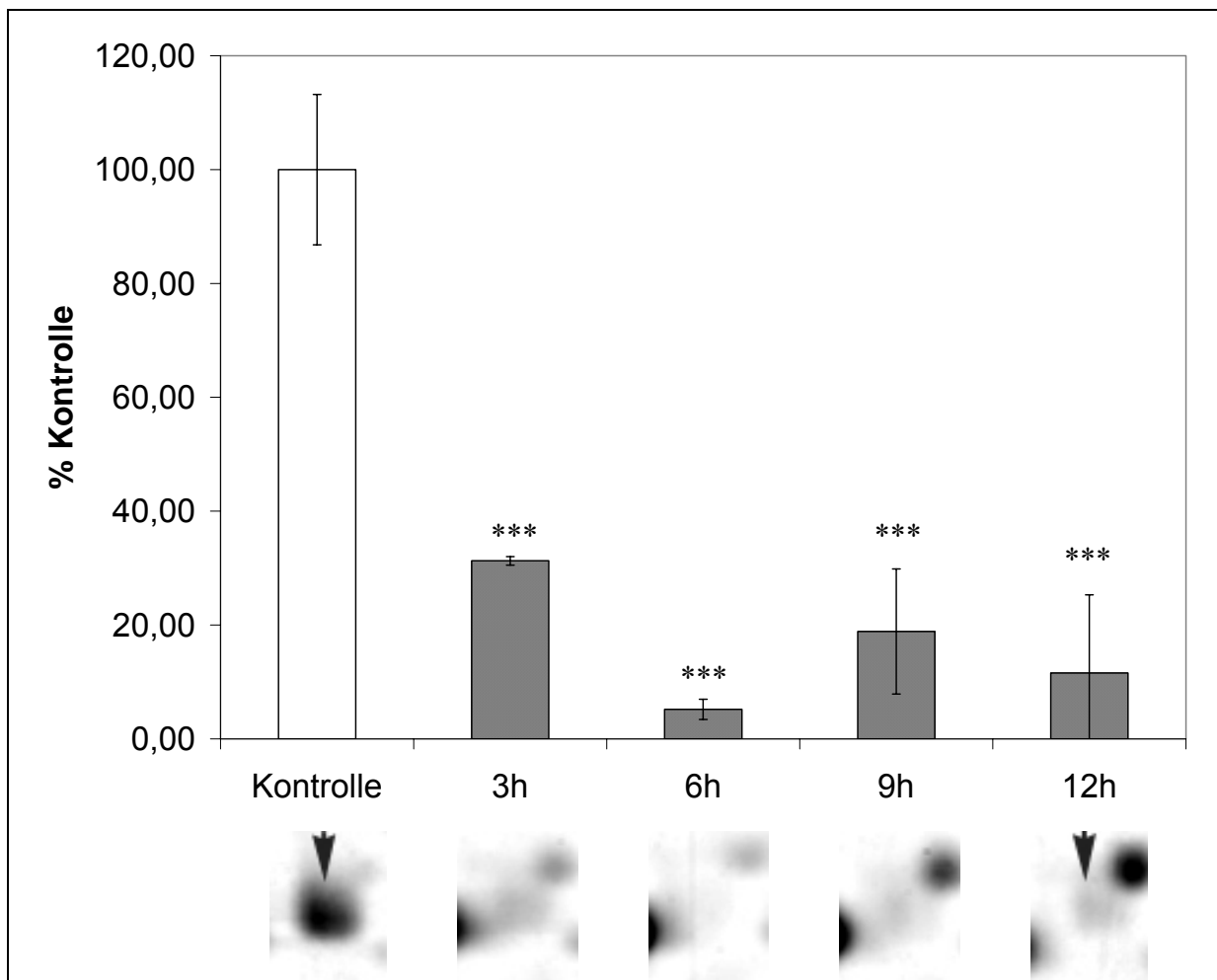


Abb. 3.63: Mittlere Intensität des durch 2D-SDS-PAGE aufgetrennten sEF2b-Protein-Spots nach Behandlung von Neuroblastomzellen mit 500 μ M Flufenaminsäure über 3 h, 6 h, 9 h und 12 h. Das Säulendiagramm gibt, bezogen auf die unbehandelten Kontroll-Proben, die densitometrische Auswertung der mit Silber gefärbten Spots in Prozent \pm SD an. Die Sterne bezeichnen einen statistisch signifikanten Unterschied zur Kontroll-Gruppe (*** : $p \leq 0,001$).

Man kann keine abschließende Aussage darüber treffen, wann sEF2b herunter reguliert wurde. Aber es kann als gesichert angenommen werden, dass, wie bei den meisten anderen analysierten Proteinen auch, die Regulation schon sehr früh nach der Applikation des NSAR einsetzte.

Stellt man die Aminosäuresequenzen von eEF2 und sEF2b gegenüber, so fällt auf, dass sEF2b mit der C-terminalen Seite von eEF2 ab Arg330 identisch ist (Abb. 3.64). Die in der NCBI-Datenbank für sEF2b eingetragene Sequenz beginnt N-terminal mit einem Arginin und nicht mit Methionin, was auf eine post-translationale Prozessierung von eEF2 hindeutet, da bei sonst keinem anderen Protein die analysierten Fragmente vorkommen. Jedoch wäre auch möglich, dass sEF2b durch interne Initiation der Translation reguliert wird, da N-terminal vor dem ersten analysierten Protein-Fragment noch fünfmal Methionin vorkommt, das nur durch AUG codiert wird, was wiederum ein potentielles Start-Codon ist.

Beim Vergleich der durch MALDI-TOF analysierten Protein-Fragmente für die bereits beschriebene Isoform von eEF2 und für sEF2b wird außerdem deutlich, dass die analysierten Fragmente für sEF2b in einem Abschnitt von eEF2 vorkommen, der bei der identifizierten Isoform von eEF2 offenbar fehlt (Abb. 3.64).

N-Terminus	
eEF2	1 MDKKANIRNM SVIAHVDHKG STLTDSLVC AGIISARAG ETRFTDTRKD EQERCITIKS
eEF2	61 TAISLFYELS ENDLNFIKQS KDGAGFLINL IDSPGHVDFS SEVTAALRVT DGALVVVDCV
eEF2	121 SGVCVQTETV LRQAIAERIK PVLMMNKMDR ALLELQLEPE ELYQTFQRIV ENVNVIISTY
eEF2	181 GEGESGPMGN IMIDPVLGTV GFGSGLHGWA FTLKQFAEMY VAKFAAKGEG QLGPAERAKK
eEF2	241 VEDMMKKLWG DRYFDPANGK FSKSATSPEG KKLPRTFQCQL ILDPFKVFD AIMNFKKEET
sEF2b	1 R WLPAGDALLQ MITIHLPSV TAQKYRCELL
eEF2	301 AKLIEKLDIK LDSEDKDKEG KPLLKAVMRR WLPAGDALLQ MITIHLPSV TAQKYRCELL
sEF2b	32 YEGPPDDEAA MGIKSCDPKG PLMMYISKMV PTSDKGRFYA FGRVFSGLVS TGLKVRIMGP
eEF2	361 YEGPPDDEAA MGIKSCDPKG PLMMYISKMV PTSDKGRFYA FGRVFSGLVS TGLKVRIMGP
sEF2b	92 NYTPGKKEDL YLKPIQRTIL MMGRYVEPIE DVPCGNIVGL VGVDQFLVKT GTITTFEHAH
eEF2	421 NYTPGKKEDL YLKPIQRTIL MMGRYVEPIE DVPCGNIVGL VGVDQFLVKT GTITTFEHAH
sEF2b	152 NMRVMKFSVS PVVRVAVEAK NPADLPKLVE GLKRLAKSDP MVQCHIESG EHIAGAGEL
eEF2	481 NMRVMKFSVS PVVRVAVEAK NPADLPKLVE GLKRLAKSDP MVQCHIESG EHIAGAGEL
sEF2b	212 HLEICLKDLE EDHACIPIKK SDPVVSYRET VSEESNVLCL SKSPNKHNL YMKARPPFDG
eEF2	541 HLEICLKDLE EDHACIPIKK SDPVVSYRET VSEESNVLCL SKSPNKHNL YMKARPPFDG
sEF2b	272 LAEDIDKGEV SARQELKQRA RYLAEKYEWV VAEARKIWCF GPDGTGPNIL TDITKGVQYL
eEF2	601 LAEDIDKGEV SARQELKQRA RYLAEKYEWV VAEARKIWCF GPDGTGPNIL TDITKGVQYL
sEF2b	332 NEIKDSVVAG FQWATKEGAL CEENMRGVRF DVHDTVTLHAD AIHRGGGQII PTARRCLYAS
eEF2	661 NEIKDSVVAG FQWATKEGAL CEENMRGVRF DVHDTVTLHAD AIHRGGGQII PTARRCLYAS
sEF2b	392 VLTAQPRIME PIYLVEIQCP EQVVGGIYGV LNRKRGHVFE ESQVAGTPMF VVKAYLPVNE
eEF2	721 VLTAQPRIME PIYLVEIQCP EQVVGGIYGV LNRKRGHVFE ESQVAGTPMF VVKAYLPVNE
sEF2b	452 SFGFTADLRS NTGGQAFQPC VFDHWQILPG DPFDNSSRPS QVVAETRKRK GLKEGIPALD
eEF2	781 SFGFTADLRS NTGGQAFQPC VFDHWQILPG DPFDNSSRPS QVVAETRKRK GLKEGIPALD
sEF2b	512 NFLDKL
eEF2	841 NFLDKL
C-Terminus	

Abb. 3.64: Aminosäuresequenzen von sEF2b und eEF2. Die grün hinterlegten Sequenzen bezeichnen die nach Verdau mit Trypsin durch MALDI-TOF-Analysen identifizierten sEF2b-Protein-Fragmente, während die grau hinterlegten Sequenzen die identifizierten Fragmente der 41 kDa schweren Isoform von eEF2 markieren. Ab Arg330 ist eEF2 identisch mit sEF2b. Die identifizierten Aminosäuresequenzen von eEF2 und sEF2b überlappen sich nicht.

Für eEF2 wurde bereits gezeigt, dass die Expression der mRNA, die auch für sEF2b als Matrize fungiert, keine statistisch signifikante Änderung aufweist (Abb. 3.62). Es ist daher anzunehmen, dass sEF2b durch post-translationale Prozessierungen oder durch alternative Translation reguliert wird, indem die Translation von einem internen AUG-Codon startet.

4. Diskussion

4.1. Wirkung von nichtsteroidalen Antirheumatika auf Zellen der Neuroblastom-Zelllinie KELLY

Als im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Versuchen zur Wirkung von nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) auf Neuroblastomzellen unter besonderer Berücksichtigung der bereits häufig beschriebenen pro-apoptotischen Wirkung von NSAR begonnen wurde, waren über diese spezielle Fragestellung noch keine Daten veröffentlicht worden. Im Jahr 2004 zeigten J. I. Johnsen et al. jedoch erstmals, dass die NSAR Diclofenac und Celecoxib *in vivo* hemmend auf Größe und Wachstum von Neuroblastomen und *in vitro* fördernd auf apoptotische Prozesse verschiedener Neuroblastom-Zelllinien wirken (Johnsen JI, et al., 2004). Da eine Aktivierung der Caspasen 9 und 3 nachgewiesen werden konnte, wurde angenommen, dass die NSAR-induzierte Apoptose der Neuroblastomzellen über den intrinsischen apoptotischen Signalweg vermittelt wird (Kap. 1.2.2.4., Abb. 1.5).

Alle Zelllinien und 27 der 28 untersuchten Tumoren zeigten dabei insbesondere eine Expression von Cox-2, so dass die beschriebenen Wirkungen der eingesetzten NSAR in erster Linie in Verbindung mit der Hemmung der Cox-2 gesehen wurden. Jedoch wurden auch Cox-2-unabhängige Mechanismen, wie sie bereits bei anderen Tumoren und Zelllinien beschrieben wurden (Kap. 1.2.2.4.), für möglich gehalten.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen zum einen die wachstumshemmende und pro-apoptotische Wirkung von NSAR, insbesondere von Flufenaminsäure, zum anderen zeigen sie deutlich, dass auch Proteine, die bisher nicht in Zusammenhang mit NSAR-vermittelter Apoptose gebracht wurden, von dem NSAR Flufenaminsäure reguliert werden und Einfluss auf apoptotische oder proliferationshemmende Prozesse haben können.

Die ersten Untersuchungen der Wirkung von drei unselektiven Cox-1/Cox-2-Inhibitoren, Acetylsalicylsäure (ASS), Flufenaminsäure und Sulindac, auf die mithilfe von MTT-Tests gemessene mitochondriale Aktivität der Zellen der Neuroblastom-Zelllinie KELLY zeigten vor allem für Flufenaminsäure eine stark hemmende Wirkung (Kap. 3.1., Abb. 3.1). Da die Ergebnisse für ASS und Sulindac deutlich moderater ausfielen, wurde Flufenaminsäure für die zu untersuchende Fragestellung als Modells substanz ausgewählt. Bei weiteren Aktivitätsmessungen der Neuroblastomzellen unter dem Einfluss von Flufenaminsäure in Abhängigkeit der Konzentration und Zeit fiel auf, dass in den gewählten Behandlungszeiten von 3 h, 6 h, 9 h und 12 h bis zu Konzentrationen von 300 bzw. 400 μM Flufenaminsäure die mitochondriale Aktivität zum Teil deutlich anstieg (Abb. 3.2). Bei 500 μM Flufenaminsäure war für jede der vier Behandlungszeiten im Vergleich zur nächst geringeren Konzentration eine deutliche relative Aktivitätsabnahme und für 9- bzw. 12-stündige Behandlung eine

absolute Abnahme auf knapp über 80 bzw. 75 % der unbehandelten Kontrolle zu beobachten, so dass diese Konzentration für die Proteomanalysen gewählt wurde.

Lichtmikroskopische Untersuchungen der Zellen sollten Aufschluss darüber geben, inwieweit sich die Zellmorphologie unter der Behandlung mit Flufenaminsäure verändert. Überraschenderweise kam es nur bei der höchsten Konzentration von 1000 μM Flufenaminsäure zu deutlich sichtbaren Veränderungen der Morphologie, wie Abrundung der sonst eher spindelförmig gestreckten Zellkörper (Kap. 3.2., Abb. 3.3 – 3.7). Unter Behandlung mit 500 μM Flufenaminsäure war jedoch im Vergleich zu geringeren Konzentrationen ab einer Behandlungszeit von 9 h eine Hemmung der Proliferation zu erkennen, die sich in weniger dichten Zellrasen äußerte. Diese Beobachtungen haben die Wahl der Konzentration von 500 μM Flufenaminsäure für die Proteomanalysen bestätigt.

Die Untersuchungen der Neuroblastomzellen mit Acridinorange und Ethidiumbromid unter Behandlung mit Flufenaminsäure haben eine deutliche pro-apoptotische Wirkung des NSARs Flufenaminsäure gezeigt (Kap. 3.3.1., Abb. 3.9 – 3.12). Diese Wirkung war jedoch nur bis zu einer Konzentration von 500 μM zu beobachten. Bei der nächst höheren Konzentration von 1000 μM war der Anteil nekrotischer Zellen größer als der apoptotischer, während bei geringeren Konzentrationen, einschließlich 500 μM , der Anteil der nekrotischen Zellen in der Größenordnung der Kontrolle lag. Nach 24-stündiger Behandlung der Zellen mit 500 μM Flufenaminsäure lag der Gesamtanteil lebender Zellen bei knapp unter 50 %. Man kann aufgrund dieser Beobachtungen einerseits davon ausgehen, dass bei einer Konzentration von 500 μM Flufenaminsäure die Zellen in der Hauptsache den apoptotischen Zelltod einleiten bzw. sterben, und andererseits, dass nach 12 h Behandlungszeit der Großteil der Zellen noch lebt, was sich auch in den Ergebnissen der MTT-Tests widerspiegelt.

Die FACS-Analysen mit Propidiumjodid bestätigten in der Tendenz die bisherigen Ergebnisse (Kap. 3.3.2.). So nahm der Anteil der Zellen, die im sogenannten Sub-G₁-Peak, der für apoptotische Zellen steht, gezählt wurden, für Behandlungszeiten von 9 h und 12 h ab einer Konzentration von 200 μM Flufenaminsäure deutlich zu (Abb. 3.19).

Darüber hinaus gaben die Propidiumjodid-FACS-Analysen Hinweise darauf, dass bei höheren Konzentrationen Flufenaminsäure den Zellzyklus in der G₂/M-Phase hemmt, da ab einer Konzentration von 200 μM Flufenaminsäure und ab einer Behandlungszeit von 6 h der Anteil der Zellen in der G₂/M-Phase in Relation zu geringeren Konzentrationen zunahm, während der Zellanteil in der G₀/G₁-Phase abnahm (Abb. 3.14 – 3.18).

Weitere Untersuchungen der mRNA-Expression der Cyclooxygenasen 1 und 2 unter der Behandlung mit 500 μM Flufenaminsäure haben ergeben, dass Cox-1 in der Neuroblastom-Zelllinie KELLY überhaupt nicht exprimiert wird. Die Expression von Cox-2 nahm jedoch über die Zeit der Behandlung ungefähr um das 9-fache zu (Kap. 3.4., Abb. 3.20). Dieses zunächst überraschende Ergebnis, da der Cox-1/Cox-2-Inhibitor Flufenaminsäure als Stimulator der Cox-2-Expression zu fungieren scheint, wird durch eine Arbeit von X. Lu et al. bestätigt, bei der gezeigt werden konnte, dass verschiedene NSAR, unter anderen auch Flufenaminsäure, parallel zu apoptotischen und zytotoxischen Prozessen eine vermehrte Expression von Cox-2-mRNA und -Protein bewirken (Lu X et al., 1995). Auch für den

selektiven Cox-2-Hemmer CGP 28238 wurde ein induzierender Effekt auf die Cox-2-mRNA-Expression beschrieben (Klein T et al., 1997). In beiden Veröffentlichungen wird deutlich, dass für diese Effekte die NSAR in Konzentrationen eingesetzt werden müssen, die weit über den für eine effektive Cyclooxygenase-Hemmung notwendigen Konzentrationen liegen. Es liegt daher die Vermutung nahe, dass verschiedene NSAR in höheren Konzentrationen unter anderem durch die Stimulation der Cox-2-Expression über bisher unbekannte Mechanismen wirksam sind. Ob eine erhöhte Cox-2-Expression im Zusammenhang steht mit der Einleitung der Apoptose oder der Hemmung der Proliferation von Zellen, die mit hohen Konzentrationen von NSAR behandelt werden, müsste weiter untersucht werden. Die Ergebnisse der Proteomanalysen haben jedoch gezeigt, dass verschiedene andere Proteine an den pro-apoptotischen und anti-proliferativen Effekten von Flufenaminsäure, die in weiteren Versuchen noch untersucht wurden, beteiligt zu sein scheinen, während eine differentielle Cox-2-Expression nicht nachgewiesen werden konnte.

Die Konzentrationsbestimmungen der Prostanoid Prostaglandin (PG) E₂, Thromboxan (Tx) B₂ und der F-Isoprostane aus dem Zellüberstand der kultivierten Neuroblastomzellen zeigte bei 500 µM Flufenaminsäure eine deutliche Hemmung ihrer Synthese, so dass man bei dieser Konzentration auch von einer effektiven Cyclooxygenase-Hemmung ausgehen konnte (Kap. 3.5., Abb. 3.21 – 3.23).

Differentielle Proteomanalysen der Neuroblastomzellen, die über 3 h, 6 h, 9 h und 12 h mit Flufenaminsäure behandelt wurden, sollten Aufschluss darüber geben, welche Proteine parallel zu den beschriebenen Prozessen reguliert werden und daher im Zusammenhang mit der proliferationshemmenden und pro-apoptotischen Wirkung des NSAR Flufenaminsäure auf die Neuroblastomzellen stehen könnten.

4.2. Durch Behandlung von Neuroblastomzellen mit Flufenaminsäure regulierte Proteine

Zahlreiche Untersuchungen belegen einen deutlichen Einfluss der Wirkstoffklasse der NSAR auf die Hemmung der Tumorgenese und auf die Induktion apoptotischer Prozesse (Kap. 1.2.2.). Für diese Wirkungen wurden bereits eine ganze Reihe von Mechanismen beschrieben und diskutiert (Kap. 1.2.2.4. und 1.2.2.5.). Dennoch ist ein eindeutiger Wirkmechanismus oder ein Zusammenspiel der diskutierten Mechanismen noch weitgehend ungeklärt.

Im Hinblick auf die beobachtete anti-proliferative und pro-apoptotische Wirkung des NSAR Flufenaminsäure auf Zellen der Neuroblastom-Zelllinie KELLY, wurden die Proteinexpressionsmuster dieser Zelllinie, die über verschiedene Zeiträume mit 500 μ M Flufenaminsäure behandelt wurde, mit solchen von unbehandelten KELLY-Zellen verglichen. Dafür wurden differentielle Proteomanalysen durchgeführt und zwölf Protein-Spots, die unter dem Einfluss von Flufenaminsäure reguliert wurden, mittels MALDI-TOF und Datenbank-Recherchen identifiziert (Abb. 3.24 und Tab. 3.1 und 3.2).

Nur bei drei der zwölf identifizierten Proteinen stimmten die beobachteten Werte für Molekulargewicht und isoelektrischem Punkt (MW / pI) in den 2D-Gelen mit den theoretischen Werten der Datenbanken überein. Die abweichenden Werte der neun anderen Proteine können durch post-translationale Modifikationen, wie zum Beispiel Phosphorylierungen, durch proteolytische Prozessierungen zu verschiedenen Isoformen oder durch alternatives Spleißen der mRNA erklärt werden. In den nachfolgenden Kapiteln sollen die unterschiedlichen Erklärungsmöglichkeiten für die jeweiligen Proteine im einzelnen diskutiert werden.

Einige der unter Flufenaminsäure differentiell regulierten Proteine wurden in der Literatur bereits im Zusammenhang mit Apoptose oder Krebs beschrieben, wodurch die Ergebnisse dieser Arbeit zum Teil ihre Bestätigung finden. Jedoch wurden diese Zusammenhänge im allgemeinen nicht in direkter Verbindung zur Wirkung von NSAR gesehen.

Die identifizierten Proteine können daher Ansatzpunkte zur weiteren Erforschung der pro-apoptotischen und anti-proliferativen Wirkung von NSAR bieten und möglicherweise als neue pharmakologische Targets genutzt werden.

Die für die vorliegende Arbeit angewandte Methode der zweidimensionalen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (2D-SDS-PAGE) ist eine hochauflösende Technik zur Trennung komplexer Proteingemische, die allerdings durchaus Grenzen hat (Kap. 1.3.3.). So können viele Proteine, die in zu geringem Umfang exprimiert werden, nicht detektiert werden, andere, besonders Membranproteine, sind mitunter so hydrophob, dass sie kaum in Lösung gebracht oder gehalten werden können, und wieder andere sind so sauer bzw. basisch, dass sie mit der 2D-SDS-PAGE nicht aufgetrennt werden. Aufgrund dieser Einschränkungen und aufgrund der Tatsache, dass nur der pI-Bereich von 4 bis 7 untersucht wurde, ist davon

auszugehen, dass die identifizierten Proteine nur einen Teil der durch Flufenaminsäure regulierten Proteine darstellen.

4.2.1. Regulation von Hsp75/TRAP1

Eines der zwölf Proteine, die durch die Behandlung der Neuroblastom-Zelllinie KELLY mit dem NSAR Flufenaminsäure reguliert wurden, ist als „Heat shock protein 75“ (Hsp75) identifiziert worden. Bei der differentiellen Proteomanalyse war bereits nach 3-stündiger Behandlungszeit eine Zunahme der Intensität des Hsp75-Spots auf das 2½-fache der Kontroll-Gruppe zu beobachten. Nach längerer Behandlungszeit von bis zu 12 h war gegenüber der Kontrolle eine Intensitätszunahme auf über 300 % auszumachen (Abb. 3.25).

Es sind bisher einige Arbeiten zur Regulation und Funktion von Hsp75 veröffentlicht worden, die zum großen Teil einen Zusammenhang mit apoptotischen Prozessen beschreiben.

1996 identifizierte C.-F. Chen et al. Hsp75 als ein neues Mitglied der sogenannten Hsp90-Familie, deren Mitglieder als molekulare Chaperone fungieren (Chen CF, et al., 1996). Bereits ein Jahr früher war von H. Y. Song et al. ein Protein beschrieben worden, das wie Hsp75 starke Homologie zu Hsp90 aufwies und Interaktionen mit dem Typ 1 des Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptors (TNFR-1) zeigte. Daher wurde dieses Protein als „TNF receptor-associated protein 1“ (TRAP1) bezeichnet (Song HY, et al., 1995). Sorgfältige Untersuchungen der Sequenzen haben ergeben, dass Hsp75 und TRAP1 identisch sind (Felts SJ, et al., 1999). Daher wird im folgenden Hsp75 bzw. TRAP1 als TRAP1/Hsp75 bezeichnet.

H. Y. Song et al. zeigte, dass TRAP1/Hsp75 an der intrazellulären Domäne des 55 kDa TNFR-1 (TNFR-1IC) bindet. Bei den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Bindungsstellen für TRAP1/Hsp75 diffus verteilt außerhalb der für die Zytotoxizität verantwortlichen C-terminalen Domäne von TNFR-1IC liegen, und dass für die Interaktion kein vermittelndes drittes Protein nötig ist.

Schon seit geraumer Zeit ist bekannt, dass TNF über den TNFR-1-Signalweg das Wachstum hemmt und zytotoxisch wirkt (Vilček J, Lee TH, 1991). Diese Wirkung kann auch unabhängig vom extrazellulären Liganden TNF stattfinden, indem TNFR-1 spontan zu Trimeren aggregiert und so den intrazellulären Signaltransduktionsweg einleitet (Song HY, et al., 1994; Boldin MP, et al., 1995). Diese Selbst-Aggregation wird reguliert durch SODD („Silencer Of Death Domain“), einem Protein, das mit Hsc70, einem anderen Hitzeschock-Protein, das durch Flufenaminsäure reguliert wird, interagiert (Jiang Y, et al., 1999; Miki K, Eddy EM, 2002) (Kap. 4.2.7.). So könnte also auch TRAP1/Hsp75 über den TNFR-1-Signalweg an Mechanismen beteiligt sein, die über Tod und Überleben von Zellen entscheiden.

In der Arbeit von C.-F. Chen et al. wurde für TRAP1/Hsp75 als molekulares Chaperon die Fähigkeit beschrieben, denaturiertes Retinoblastom-Protein (Rb) wieder in seine native Form zu falten (Chen CF, et al., 1996). Diese Reaktion von TRAP1/Hsp75 mit Rb wurde während der Mitose und nach Hitzeschock beobachtet, wobei im letzteren Fall zusätzlich noch eine

Translokation von TRAP1/Hsp75 in den Zellkern stattfand. C.-F. Chen et al. zeigte, dass erst durch die Chaperonisierung durch TRAP1/Hsp75 denaturiertes Rb für eine Spaltung durch Trypsin zugänglich wurde.

Um die Bedeutung der Chaperonisierung von Rb durch TRAP1/Hsp75 besser einordnen zu können, soll hier kurz auf die Funktion von Rb im Organismus eingegangen werden. Diese ist zwiespältig. Einerseits ist Rb ein typischer Tumorsuppressor, der die Zell-Proliferation hemmt, indem er die Transkription unterdrückt, andererseits wird aber auch die Apoptose durch Rb gehemmt (Chau BN, Wang JYJ, 2003).

Als Tumorsuppressor blockiert Rb die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie (E2F1, E2F2, E2F3), die für die Expression einer Reihe von Genen verantwortlich gemacht werden, die am Fortgang des Zellzyklus beteiligt sind (Harbour JW, Dean DC, 2000; Flemington EK, et al., 1993; Helin K, et al., 1993; Sellers WR, et al., 1995; Zhu L, et al., 1993). So wird durch Rb der Übergang von der G₁- in die S-Phase gehemmt (Weinberg RA, 1995; Johnson DG, et al., 1993). Zusätzlich werden durch Rb Chromatin-modifizierende Enzyme, wie HDAC1 bis 3 (Histon-Deacetylasen), BRG1 und Brm, so reguliert, dass durch sie zusätzlich die Transkription gehemmt wird (Luo RX, et al., 1998; Magnaghi JL, et al., 1998; Dunaief JL, et al., 1994; Singh P, et al., 1995). Für den Fortgang des Zellzyklus in die S-Phase muss Rb inaktiviert werden. Das geschieht, indem Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs) Rb phosphorylieren (Sherr CJ, 1996).

Für die Apoptose-hemmende Wirkung von Rb werden verschiedene Wege diskutiert. Ein Weg führt über die Hemmung des Transkriptionsfaktors E2F1, der ungehemmt über einen speziellen Signalweg die Akkumulation des pro-apoptotischen Proteins p53 bewirkt und damit Apoptose induziert. Ein p53-unabhängiger Weg führt über das p53-Homologon p73, das unter dem Einfluss von E2F1 ebenfalls akkumuliert und den programmierten Zelltod vermittelt (Nevins JR, 2001). Bei einem Verlust der Funktion von Rb, kann so E2F1-vermittelt Apoptose eingeleitet werden.

Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass für die Aufhebung der Apoptose-hemmenden Wirkung von Rb eine spezifische Spaltung des Proteins notwendig ist. So geht ein TNF- oder CD95-vermittelter Zelltod einher mit der spezifischen Spaltung von Rb durch Proteasen der Caspase-Familie (Tan X, et al., 1997). Aus der Literatur ist bekannt, dass TNF-induzierte Apoptose über den TNF-Rezeptor 1 (TNFR-1) vermittelt wird (Piguet PF, et al., 1998). Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass Fibroblasten, die ein Rb exprimieren, das eine Mutation in einer für die Spaltung durch Caspasen wichtigen C-terminalen Aminosäuresequenz aufweist, trotz Induktion über TNFR-1 nicht apoptotisch werden, obwohl durch TNFR-1 sowohl Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt, als auch Caspase-3 aktiviert wird (Chau BN, et al., 2002). Das zeigt im Umkehrschluss, dass für die Einleitung der Apoptose eine spezifische Spaltung von Rb durch Caspasen nötig ist.

Interessanterweise sind sowohl TNFR-1 als auch Rb Zielstrukturen von TRAP1/Hsp75, so dass die Vermutung nahe liegt, dass TRAP1/Hsp75 ein Bindeglied in der durch TNFR-1 vermittelten Spaltung von Rb und damit in der Einleitung der Apoptose spielen könnte. Dabei ist besonders zu bedenken, dass, wie oben schon erwähnt, erst nach Chaperonisierung durch

TRAP1/Hsp75 denaturiertes Rb durch Trypsin gespalten werden konnte (Chen CF, et al., 1996). Ob TRAP1/Hsp75 den gleichen Effekt auf Rb für die Spaltung durch Caspasen hat und ob und wie daran TNFR-1 beteiligt ist, bleibt zu untersuchen.

Fest steht, dass bei den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit TRAP1/Hsp75 unter dem Einfluss von Flufenaminsäure hoch reguliert wurde, und dass diese Regulation einherging mit apoptotischen Prozessen. In der Literatur findet man nur wenige Arbeiten zur Regulation von TRAP1/Hsp75 unter dem Einfluss von Apoptose-induzierenden Wirkstoffen.

Von S. H. Kim et al. wurde gezeigt, dass die Zytostatika Vincristin, Vinblastin, (Colchicin,) Bleomycin und Doxorubicin TRAP1/Hsp75 zusammen mit Hsp60 in den Mitochondrien von HeLa-Zellen deutlich hoch regulierten, während parallel dazu die Konzentration des anti-apoptotischen Hsp70 im Zytoplasma abfiel (Kim SH, Kim D, Jung GS, et al., 1999). Dieser Regulation war eine partielle Phosphorylierung des „Heat shock factors 1“ (HSF1) vorgeschaltet, verbunden mit einer erhöhten HSF1-DNA-Bindungsaktivität, was auf eine transkriptionale Regulation der Hsp-Expression hindeutete. Auch für die NSAR Indomethacin und Salicylat konnte eine erhöhte HSF1-Aktivität nachgewiesen werden, wodurch auch diese Wirkstoffe in den Zusammenhang mit einer transkriptionalen Regulation der Hsp-Expression gebracht wurden (Lee BS, et al., 1995; Jurvich D, et al., 1992). In der Arbeit von S. H. Kim et al. konnte außerdem eine zeitliche Korrelation zwischen der erhöhten Expression von TRAP1/Hsp75 und Hsp60 und der Suppression von Hsp70 mit der Aktivierung des JNK/SAPK(c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase)-Signalwegs nachgewiesen werden. JNK/SAPK ist ein Mitglied der MAPK(mitogen-activated protein kinase)-Familie, das bei Stress-induzierter Apoptose früh hoch reguliert und von Hsp70 gehemmt wird (Mosser DD, et al., 1997; Gabai VL, et al., 1997). Bei verschiedenen chemotherapeutisch eingesetzten Wirkstoffen ist eine Hochregulation von JNK/SAPK bereits beschrieben worden (Osborn MT, Chambers TC, 1996; Wang TH, et al., 1998).

In einer weiteren Arbeit bringt S. H. Kim et al. die bereits beschriebenen Effekte der Zytostatika auf die Expression von Hsp75 und Hsp70 in den Zusammenhang mit den Ku-Autoantigenen Ku70/80 (Kim SH, Kim D, Han JS, et al., 1999). Ku70/80 sind DNA-bindende Komponenten einer DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK), die an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt ist; in dieser Arbeit erzeugt durch ionisierende Strahlen oder Etoposid (He DM, et al., 1996). Es wird angenommen, dass zwischen Ku70/80 und der DNA-Bindungsaktivität von HSF1 eine inverse Korrelation besteht (Liu RY, et al., 1993; Yang SH, et al., 1996). Tatsächlich wurden Ku70/80 unter dem Einfluss verschiedener Zytostatika Caspase-3-abhängig herunter reguliert, verbunden mit einer erhöhten HSF1-DNA-Bindungsaktivität und gefolgt von einer Hochregulation von Hsp75 und Herunterregulation von Hsp70.

H. A. Collier et al. wiederum hat einen Zusammenhang zwischen Myc-vermittelter Apoptose und einer vermehrten Expression von TRAP1/Hsp75 beobachtet (Collier HA, et al., 1999). Das Protoonkogen c-Myc ist an Zell-Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt. Es ist durch mitogene Stimulation schnell induzierbar und wird während der zellulären Differenzierung herunter reguliert (Henriksson M, Luscher B, 1996). Zellen, die Myc

überexprimieren, können in hohem Maße apoptotisch sein. H. A. Collier identifizierte TRAP1/Hsp75 als ein Protein, dessen Expression durch Myc direkt induziert wurde. TRAP1/Hsp75 könnte daher eine Rolle bei der Myc-vermittelten Apoptose spielen. Bedenkt man, dass TRAP1/Hsp75 mit TNFR-1 interagiert, wird diese Annahme durch die Beobachtung erhärtet, dass Myc-überexprimierende Zellen eine erhöhte Empfänglichkeit gegenüber TNF- α -vermittelte Apoptose besitzen (Kleefstrom J, et al., 1994).

Eine Arbeit von Y. Masuda et al. beschreibt jedoch eine Reduktion der TRAP1/Hsp75-Expression unter dem Einfluss von Apoptose-induzierenden Wirkstoffen (Masuda Y, et al., 2004). Bei zwei Zelllinien nahm durch die Behandlung mit β -Hydroxyisovalerylshikonin (β -HIVS), einer Apoptose-induzierenden Komponente von *Lithospermum radix*, oder Etoposid die Konzentration von TRAP1/Hsp75 während der Apoptose deutlich und zeitabhängig ab. Es bleibt jedoch unklar, mit welchen der bereits für TRAP1/Hsp75 beschriebenen Mechanismen diese Beobachtungen im Zusammenhang stehen könnten.

Aus der Literatur wird deutlich, dass die Funktionen und damit verbundenen Mechanismen von TRAP1/Hsp75 bisher nur im Ansatz verstanden werden. Als sicher anzunehmen ist, dass eine erhöhte TRAP1/Hsp75-Expression mit einer vermehrten Chaperonisierung von Rb einhergeht. Welche Funktion diese Chaperonisierung hat, ist jedoch noch nicht genau bekannt. Zu untersuchen wäre, ob das Ziel der Chaperonisierung die Wiederherstellung der Rb-Funktion ist, um die Transkription über den E2F-Signalweg zu hemmen, oder ob es Ziel ist, durch eine Chaperonisierung die Phosphorylierung oder spezifische Spaltung von Rb zu ermöglichen, wodurch Rb seine Funktion verlieren würde, und die Apoptose eingeleitet werden könnte. Da eine spezifische Spaltung von Rb durch Trypsin nach Chaperonisierung durch TRAP1/Hsp75 bereits beschrieben wurde, und da im Zusammenhang mit TNFR1-vermittelter Apoptose eine spezifische Spaltung von Rb durch Caspase-3 beobachtet wurde, könnte als Hypothese angenommen werden, dass TRAP1/Hsp75 über eine Interaktion mit TNFR-1 Rb für die spezifische Spaltung durch Caspase-3 chaperonisiert und so positiv Einfluss auf die Apoptose nimmt. Ob es sich tatsächlich so verhält, muss in entsprechenden Versuchen allerdings weiter untersucht werden.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das NSAR Flufenaminsäure, das die Cyclooxygenasen 1 und 2 unselektiv hemmt, parallel zu apoptotischen Prozessen TRAP1/Hsp75 deutlich hoch reguliert. Da bekannt ist, dass NSAR pro-apoptotische Wirkungen haben und diese bei den Versuchen für diese Arbeit beobachtet wurden, und da ein Anstieg von TRAP1/Hsp75 bereits im Zusammenhang mit Apoptose beschrieben wurde, ist anzunehmen, dass TRAP1/Hsp75 an NSAR-vermittelter Apoptose beteiligt ist.

Es stellt sich jedoch die Frage, wie TRAP1/Hsp75 im Zusammenhang mit NSAR-vermittelter Apoptose reguliert wird. Unter dem Einfluss von Flufenaminsäure wurde die Transkription von TRAP1/Hsp75 zwar schnell, aber nicht stark hoch reguliert (Abb. 3.29). Auch über längere Behandlungszeiten bis zu 8 h stieg die Expression der TRAP1/Hsp75-mRNA nicht über das 1½-fache hinaus an. In den Arbeiten jedoch, die unter dem Einfluss anderer Apoptose-induzierender Stoffe eine Zunahme von TRAP1/Hsp75 beschrieben, nahm die Transkription gemessen an der TRAP1/Hsp75-mRNA auf das 4- bis 7-fache zu. Daher kann

angenommen werden, dass die in dieser Arbeit beschriebene Hochregulation von TRAP1/Hsp75 nicht nur von einer leicht erhöhten Transkription, sondern auch von einer vermehrten Translation herrührt.

Die Western-Blot-Analysen der 2D-Gele im Bereich des identifizierten TRAP1/Hsp75-Spots haben deutlich gemacht, dass es verschiedene Protein-Spots gibt, die mit dem TRAP1-Antikörper reagierten (Abb. 3.28). Die Unterschiede im Molekulargewicht (MW) und/oder isoelektrischen Punkt (pI) können aufgrund post-translationaler Modifikationen, Abspaltungen von Aminosäuresequenzen oder durch Prozessierung der jeweiligen mRNA zustande kommen. Ob und wie diese beobachteten Modifikationen bzw. Isoformen durch Behandlung mit Flufenaminsäure reguliert werden, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden, und müsste noch weiter untersucht werden.

Sollten die modifizierten TRAP1/Hsp75-Proteinspots durch die Behandlung mit Flufenaminsäure reguliert werden, stellt sich die Frage, welcher Art die Modifikationen oder Prozessierungen sind. Der 2D-Western-Blot (Abb. 3.28) beschreibt einen pI-Gradienten von ca. pI 6,05 – 6,2, also eine Differenz von ca. Δ pI 0,15. Mithilfe des „Scansite Molecular Weight & Isoelectric Point Calculators“ kann die Veränderung des pI und des MW durch die häufigste posttranslationale Modifikation, die Phosphorylierung, berechnet werden (http://scansite.mit.edu/calc_mw_pi.html). Dabei ergab sich für die erste Phosphorylierung eine Differenz von Δ pI 0,1 und für die zweite, dritte und vierte jeweils eine pI-Differenz von Δ pI 0,08. Daher kann für benachbarte Protein-Spots der Spot-Reihe eine Phosphorylierungsreaktion ausgeschlossen werden, was nicht heißen soll, dass weiter auseinander liegende Protein-Spots sich nicht in einem Phosphat-Rest unterscheiden können. Ein deutliches Ergebnis dieser Arbeit ist, dass TRAP1/Hsp75 unter dem Einfluss des NSARs Flufenaminsäure hoch reguliert wird. Um herauszufinden, wie diese Regulation stattfindet und welche mechanistische Funktion TRAP1/Hsp75 für die Induktion der Apoptose hat, bleiben noch weitere Versuche zu unternehmen.

4.2.2. *Regulation des p97-Co-Faktors p47*

Bei den differentiellen Proteomanalysen zur Untersuchung der pro-apoptotischen Wirkung des NSAR Flufenaminsäure auf die Neuroblastom-Zelllinie KELLY wurde ein Protein-Spot, dessen Intensität unter Flufenaminsäure-Einwirkung ebenfalls zunahm, als p47, ein Co-Faktor von p97, identifiziert (Kap. 3.6.2.2., Abb. 3.30). Western-Blot-Analysen mit einem polyklonalen p47-Antikörper haben gezeigt, dass der betreffende Spot nicht das einzige Protein der Neuroblastomzellen ist, das mit dem Antikörper reagiert, sondern dass es offensichtlich eine ganze Reihe von Isoformen von p47 gibt. Bei eindimensionalen Western-Blot-Analysen waren bei der Kontrolle aus unbehandelten Zellen vier Banden zwischen ca. 42 kDa und ca. 33 kDa zu detektieren (Abb. 3.31). Die stärkste Bande lag bei ca. 42 kDa, was sich ungefähr mit den Daten aus der Literatur für p47 deckt. Die schwächeren Banden bei

ca. 38 kDa, 35 kDa und 33 kDa waren nach der Flufenaminsäure-Behandlung nicht mehr nachweisbar, während sich die mittlere Intensität der starken Bande bei 42 kDa nicht veränderte. Zweidimensionale Western-Blot-Analysen haben gezeigt, dass sich jede Bande aus einer Reihe von p47-Isoformen mit identischem Molekulargewicht, aber unterschiedlichen pI-Werten zusammensetzte (Abb. 3.33). Dabei scheint die Intensitätszunahme des ursprünglich als p47 identifizierten Protein-Spots mit einer post-translationalen Modifikation einer der p47-Isoformen gleichen Molekulargewichts erklärt werden zu können. Damit wäre auch klar, warum bei der eindimensionalen Western-Blot-Analyse die entsprechende Bande bei 42 kDa durch die Behandlung mit Flufenaminsäure keine Veränderung zeigte.

In der Literatur wurde bisher nur eine einzige post-translationale Modifikation von p47 beschrieben. So wird die Aktivität von p47 durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung über die Cdc2-Kinase reguliert (Kano F, et al., 2005). Die Abnahme bzw. das völlige Verschwinden der p47-Isoformen geringeren Molekulargewichts unter dem Einfluss von Flufenaminsäure ist nur durch proteolytischen Abbau zu erklären. In jedem Fall kann als gesichert angenommen werden, dass die auf Proteinebene gemachten Beobachtungen nicht auf eine veränderte Transkription von p47 zurückgehen, da sich die p47-mRNA-Expression über einen Behandlungszeitraum von 8 h nicht bzw. kaum veränderte (Abb. 3.34).

p97, das früher auch VCP (**v**alosi**n**-containing **p**rotein) genannt wurde und dessen Homolog bei Hefepilzen unter der Bezeichnung Cdc48 bekannt ist, gehört zur Familie der AAA-ATPasen (**A**TPases **a**ssociated with different cellular **a**ctivities). Es ist mit unterschiedlichen Co-Faktoren an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt. So ist p97 bei Membranfusionsreaktionen des Golgi-Apparats, des endoplasmatischen Retikulums (ER) und der Kernmembran involviert (Kondo H, et al., 1997; Uchiyama K, et al., 2002; Roy L, et al., 2000; Hetzer M, et al., 2001). Eine andere Funktion von p97 ist der Abbau und die Prozessierung von Proteinen, die mehrfach mit Ubiquitin gekoppelt sind (Bays NW, et al., 2001; Ye Y, et al., 2001; Braun S, et al., 2002; Hitchcock AL, et al., 2001; Rape M, et al., 2001). Zudem wurde p97 bzw. Cdc48 in der Literatur auch schon im Zusammenhang mit Apoptose erwähnt (Madeo F, et al., 1999; Shirogane T, et al., 1999).

p47 ist als Co-Faktor von p97 essentiell für die von p97 vermittelten Membranfusionsreaktionen. Es bildet als Trimer mit dem Homohexamer p97 einen festen Komplex, der post-mitotisch an der Reorganisation des Golgi-Apparats, des ER-Netzwerks und an der Formation der Kernhülle beteiligt ist (Kondo H, et al., 1997; Uchiyama K, et al., 2002; Hetzer M, et al., 2001). Die Aktivität von p47 wird bei diesen Prozessen durch Phosphorylierungsreaktionen an Ser140 reguliert. So wird zu Beginn der Mitose aus dem Kern frei werdendes p47 durch Cdc2-Kinase phosphoryliert und damit inaktiviert, um einen Fortbestand der Organisation von Golgi-Apparat und ER zu verhindern. Zum Ende der Mitose wird p47 wieder dephosphoryliert und kann so an Membranen binden und diese zum Wiederaufbau von Golgi-Apparat bzw. ER im Komplex mit p97 fusionieren (Uchiyama K, et al., 2003; Kano F, et al., 2005). Nach Abschluss dieses Prozesses wird p47 wieder im Zellkern angesiedelt.

p47 hat N-terminal eine UBA-Domäne (**Ubiquitin-assoziierte Domäne**), mit der es an Proteine bindet, die einfach Ubiquitin gebunden haben. Proteine, an die mehrfach Ubiquitin gebunden ist und dadurch für den Abbau durch Proteasome markiert sind, reagieren nicht mit p47, aber mit dem Komplex aus p97 und dem heterogenen Co-Faktor-Dimer Ufd1-Npl4 (Meyer HH, et al., 2002). Die Bindung von p47 an einfach ubiquitinierte Proteine scheint nötig für die Regulation der Membranfusionsreaktionen zu sein. Denn VCIP135, ein weiteres Adapter-Protein des p97/p47- Komplexes, besitzt Ubiquitin-abspaltende Aktivität und ist wichtig für die p97/p47-vermittelte Wiederanordnung des Golgi-Apparats (Wang Y, et al., 2004).

Bisher ist keine Arbeit bekannt, die p47 im Zusammenhang mit Apoptose oder irgendwelchen Tumorerkrankungen erwähnt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte zum einen gezeigt werden, dass es in Neuroblastomzellen verschiedene Isoformen von p47 gibt, und zum anderen, dass diese Isoformen bei apoptotischen Prozessen, die durch die Behandlung mit Flufenaminsäure eingeleitet wurden, zum Teil reguliert werden. Außerdem wurde deutlich, dass diese Regulation nicht auf einer veränderten p47-Transkription beruhte.

Ein Zusammenhang von p47 und apoptotischen Prozessen erscheint durchaus denkbar, da es bei der Apoptose zur Umbildung vieler membranöser Strukturen der Zelle kommt, bei denen eine Beteiligung des p97/p47-Komplexes nicht auszuschließen ist. Diese Annahme sollte jedoch durch weitere Versuche bestätigt und untersucht werden.

4.2.3. *Regulation des Laminin-bindenden Proteins (Lbp)*

Ein weiteres der zwölf durch Flufenaminsäure regulierten Proteine, die mithilfe der differentiellen Proteomanalyse und MALDI-TOF-MS identifiziert wurden, war ein Protein, das zur Gruppe der Nicht-Integrin-Laminin-Rezeptoren gezählt wird. Diese als Laminin-bindende Proteine (Lbp) bezeichneten Rezeptoren kommen in einer Vielzahl von Geweben als eine Gruppe von Isoformen zwischen 32 und 67 kDa vor. Dabei wird angenommen, dass das auf der Zelloberfläche lokalisierte 67 kDa Lbp ein Homodimer aus zwei 32 kDa bzw. 37 kDa Lbp-Vorläufer-Proteinen oder ein Heterodimer aus einem Vorläufer-Protein und einem bisher unbekannten Partner ist, da die isolierte mRNA nur für das 32 kDa bzw. 37 kDa schwere Lbp-Vorläufer-Protein kodiert (Landowski TH, et al., 1995; Buto S, et al., 1998; Menard S, et al., 1997). Dieses Vorläufer-Protein, das in der Literatur manchmal auch als p40 bezeichnet wird, ist im Zytoplasma lokalisiert und scheint als eine Komponente der 40S-Untereinheit der Ribosomen an der Translation von Proteinen beteiligt zu sein (Auth D, Brawerman G, 1992; Tohgo A, et al., 1994).

Laminin ist ein fast 900 kDa schweres Glycoprotein, das hauptsächlich in der Basalmembran vorkommt, bestehend aus drei Polypeptidketten, A, B1 und B2, die über Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind. Es ist an verschiedenen biologischen Prozessen wie Zellhaftung, Morphogenese, Differenzierung, Proliferation etc. beteiligt (Beck K, et al., 1990). Viele dieser

Prozesse werden durch das an der Zelloberfläche lokalisierte 67 kDa-Lbp vermittelt (Rao CN, et al., 1983; Runyan RB, et al., 1988). Laminin und 67 kDa-Lbp scheinen besonders bei entarteten Zellen eine entscheidende Rolle zu spielen, da metastasierende Tumorzellen die Basalmembran durchbrechen müssen. Dabei ist der erste und entscheidende Schritt die Anheftung der Tumorzelle an die Basalmembran. Dieser Schritt wird über die Wechselwirkung des hoch affinen Laminin-Rezeptors 67 kDa-Lbp an der Zelloberfläche mit dem Laminin der Basalmembran initiiert. Tatsächlich wird 67 kDa-Lbp bzw. das 32 kDa oder 37 kDa schwere Lbp-Vorläufer-Protein in einer Vielzahl verschiedener Tumorzellen deutlich vermehrt exprimiert (Castronovo V, 1993; Sobel ME, 1993; Pei DP, et al., 1994; Ozaki I, et al., 1998; Tanaka M, et al., 2000).

Vor dem Hintergrund dieser Arbeit sind die Untersuchungen von Y. Kaneda et al. besonders interessant. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression des Lbp-Vorläufer-Proteins, im folgenden der Einfachheit halber nur noch Lbp genannt, nicht nur mit dem Zellwachstum korreliert, sondern dass im Gegenzug durch den Verlust von Lbp Apoptose eingeleitet wird (Kaneda Y, et al., 1998). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind jedoch divergent. Betrachtet man nur die Lbp-mRNA-Expression, so scheinen diese Ergebnisse die Untersuchungen von Y. Kaneda et al. zu bestätigen, da während der beschriebenen apoptotischen Prozesse, die durch die Behandlung mit Flufenaminsäure eingeleitet wurden, der Lbp-mRNA-Gehalt zurückgeht (Abb. 3.36). Dagegen nimmt die Intensität des als 32 kDa bzw. 37 kDa Lbp identifizierten Protein-Spots über den Verlauf der Behandlung der Neuroblastomzellen mit Flufenaminsäure parallel zu den apoptotischen Prozessen zu (Abb. 3.35). Letzteres Ergebnis scheint den bekannten Funktionen und Beobachtungen von Lbp zu widersprechen, kann aber durchaus auf post-translationale Modifikationen oder proteolytische Spaltungen, die im Zusammenhang mit den apoptotischen Vorgängen stehen, zurückzuführen sein.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben in jedem Fall eine Wirkung des NSAR Flufenaminsäure auf Lbp gezeigt. Für ein anderes NSAR, Indomethacin, wurde bereits 1989 von S.-F. Aliño et al. ein Zusammenhang mit Laminin-Rezeptoren auf Tumorzellen beobachtet. Dabei wurde angenommen, dass Indomethacin die Tumorzellen durch eine erhöhte Bindungskapazität von Laminin über Laminin-Rezeptoren für natürliche Killerzellen und Makrophagen-vermittelte Zytostase sensitiviert (Aliño SF, et al., 1989). Ob Flufenaminsäure über Lbp eine ähnliche Wirkung auf die Neuroblastomzellen ausübt, oder ob die bezüglich Lbp gemachten Beobachtungen in einem anderen Zusammenhang stehen, bleibt weiter zu untersuchen.

4.2.4. *Regulation der cytosolischen Malat-Dehydrogenase (MDH1)*

Ein anderer Protein-Spot, der durch die Behandlung der Neuroblastomzellen mit Flufenaminsäure schon nach 3 h an Intensität deutlich zunahm, wurde mithilfe der MALDI-

TOF-Analyse als die cytosolische Form der Malat-Dehydrogenase (MDH1) identifiziert (Abb. 3.37). Da die MDH1-mRNA-Expression erst zu einem späteren Zeitpunkt statistisch signifikant zunahm (Abb. 3.38), ist zu vermuten, dass die auf Proteinebene beobachteten Veränderungen die Folge von translationalen bzw. post-translationalen Regulationen waren.

MDH1 kommt in hohen Konzentrationen vor allem im Herzmuskel, in Skelettmuskeln und im Gehirn vor, aber auch in Milz, Nieren, Leber, Hoden etc.. Grundsätzlich kann man sagen, dass die Verteilung von MDH1 in den Geweben mit dem zellulären Energiebedarf korreliert (Tanaka T, et al., 1996; Lo AS, et al., 2005).

Von MDH1 ist bekannt, hauptsächlich an zwei Mechanismen beteiligt zu sein. So wird einerseits im Rahmen der Gluconeogenese die cytosolische Reaktion von Malat zu Oxalacetat von MDH1 katalysiert. Dabei wird NAD^+ zu NADH reduziert. Andererseits ist MDH1 an dem sogenannten „Malat-Aspartat-Shuttle“ beteiligt, dessen Aufgabe es ist, indirekt NADH, das im Cytosol bei der Glykolyse gebildet wird, in die Matrix der Mitochondrien zu übertragen, damit es dort seine Elektronen in die oxidative Phosphorylierung der Atmungskette einbringen kann. Ein umgesetztes NADH entspricht dabei netto der Bildung von 2,5 Molekülen ATP. MDH1 dient also indirekt der Energiebereitstellung (Nelson DL, Cox MM, 2001).

Im Zusammenhang mit Krebs gibt es nur wenige Veröffentlichungen zur Expression der cytosolischen MDH1. Aus der Veterinärmedizin sind zwei Untersuchungen bekannt, bei denen neben anderen Enzymen speziell auch die Expression von MDH1 im Tumorgewebe von Mäusen, die ein hepatozelluläres Karzinom entwickelten, und von Hunden mit Seminom analysiert wurde (Arai T, et al., 2002; Washizu T, 2002). Bei beiden Untersuchungen war die mRNA-Expression von MDH1 im Tumorgewebe gegenüber der Kontrolle erhöht. Aber auch bei anderen Tumoren wurde im Zusammenhang einer vermehrten Glykolyse eine gegenüber den Kontroll-Gruppen erhöhte Expression der Malat-Dehydrogenase (MDH) beobachtet (Balinsky D, et al., 1984; Ahn YS, et al., 1994; Vriezen N, van Dijken JP, 1998; Ross CD, et al., 2000).

Ein Zusammenhang von MDH1 und Apoptose ist bisher noch nicht beschrieben worden. Im Rahmen der Untersuchungen dieser Arbeit waren durch den Einsatz des NSAR Flufenaminsäure apoptotische Veränderungen der untersuchten Neuroblastomzellen beobachtet worden. Parallel zu diesen Veränderungen waren auch Enzyme der Glykolyse (Eno-1 und PK-M1/M2) herunter reguliert worden (Kap. 3.6.3.2. und 3.6.3.4. bzw. Kap. 4.2.8. und 4.2.10.). Es bleibt zu untersuchen, ob es in Bezug auf Apoptose einen Zusammenhang zwischen der Abnahme von Eno-1 und PK-M1/M2 und der Zunahme von MDH1 gibt.

4.2.5. *Regulation des ribosomalen Proteins P0 (RbP0)*

Die differentielle Proteomanalyse der Neuroblastomzellen hat gezeigt, dass unter dem Einfluss von Flufenaminsäure auch ein mit der 60S-Untereinheit der Ribosomen assoziiertes Protein, das ribosomale Protein P0 (RbP0), reguliert wird. Nach 12-stündiger Behandlungszeit war die mittlere Intensität des RbP0-Spots auf das nahezu 4fache der Kontrolle gestiegen (Abb. 3.39). Dieses Ergebnis spiegelte sich allerdings nicht in der mRNA-Expression von RbP0 wieder, die mithilfe semiquantitativer RT-PCR untersucht wurde. Dabei stieg die Expression der RbP0-mRNA über 8 h Behandlungszeit ohne statistische Signifikanz nur sehr schwach auf ca. 110 % der Kontrolle an (Abb. 3.40). Es ist daher davon auszugehen, dass die Regulation von RbP0 unter dem Einfluss von Flufenaminsäure nicht auf eine vermehrte Transkription zurückgeht.

RbP0 bildet auf der 60S-Untereinheit der Ribosomen zusammen mit zwei weiteren sauren ribosomalen Proteinen P1 und P2 ein Pentamer (P0-P1₂-P2₂), das an der Interaktion von Elongationsfaktoren wie eEF2 (Kap. 3.6.3.5. und 4.2.11.) mit dem Ribosom während der Proteinsynthese beteiligt ist (Uchiumi T, et al., 1986, Uchiumi T, et al., 1987). Dabei scheint RbP0 essentiell für die Funktion der Ribosomen zu sein, während RbP1 und RbP2 offenbar entbehrlich sind, da auch in Abwesenheit von RbP1 und RbP2 Proteine synthetisiert werden (Remacha M, et al., 1995).

In der Literatur wird RbP0 immer wieder in Verbindung mit der Autoimmunerkrankung des systemischen Lupus erythematoses (SLE) genannt. Dabei ist RbP0 ein klassisches Autoantigen (Yoshio T, et al., 1998; Frampton G, et al., 2000; Gerli R, Caponi L, 2005). Ein Zusammenhang zwischen RbP0 und Krebs, Apoptose und/oder NSAR ist bisher kaum oder gar nicht untersucht worden.

E. Brockstedt et al. hat jedoch bei Versuchen an einer humanen Burkitt-Lymphom-Zelllinie beobachtet, dass RbP0 bei Apoptose, die durch anti-IgM-Antikörper eingeleitet wurde, reguliert wird (Brockstedt E, et al., 1998). Dabei wurde im Rahmen einer differentiellen Proteomanalyse der RbP0-Spot zum neutraleren pI verschoben, was sich mit den Beobachtungen dieser Arbeit deckt, da der als RbP0 identifizierte Spot einen pI von 6,35 aufwies, während in der Literatur für RbP0 ein pI von 5,3 beschrieben wird. Ob der veränderte pI-Wert das Resultat einer post-translationalen Modifikation oder einer proteolytischen Spaltung ist, bleibt weiter zu untersuchen. Der Zusammenhang zwischen RbP0 und Apoptose könnte auf einer außerhalb der Ribosomen liegenden Funktion beruhen. So beschreibt Grabowski et al. für RbP0 eine Funktion in der Reparatur von DNA (Grabowski DT, et al., 1991). Es konnte gezeigt werden, dass in Zellen, die mit DNA-zerstörenden Substanzen behandelt wurden, RbP0 verstärkt exprimiert wurde, und dass Tumorzellen, deren DNA-Reparatur-System defizitär ist, 30- bis 50fachen Gehalt an RbP0 aufweisen. Grabowski et al. postuliert, dass der erhöhte RbP0-Gehalt eine Gegenreaktion auf zerstörte DNA bzw. eine Kompensationsreaktion bei einem mangelhaften DNA-Reparatur-System ist (Grabowski DT, et al., 1992).

So könnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Regulation von RbP0 auch eine Gegenregulation auf apoptotische Prozesse sein, bei denen ja final ebenfalls die DNA zerstört wird. Dafür spricht die recht späte Regulation nach 12 h Behandlungszeit. Auch von E. Brockstedt et al., der RbP0 auch im Zellkern nachweisen konnte, wird diese Möglichkeit als Erklärung für den RbP0-Anstieg bei Apoptose angedacht (Brockstedt E, et al., 1998).

Für die Untersuchung der genauen Funktion von RbP0 im Zusammenhang mit der durch ein NSAR eingeleiteten Apoptose werden jedoch noch weitere Versuche nötig sein.

4.2.6. *Regulation von Dihydrolipoamid-Acetyltransferase, Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit E2 (PDC-E2)*

Das NSAR Flufenaminsäure scheint auch einen Einfluss auf die Regulation eines Proteins aus dem Pyruvat-Metabolismus zu haben. So nahm die Intensität des Protein-Spots, der als Dihydrolipoamid-Acetyltransferase, die Untereinheit E2 des Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (PDC-E2), identifiziert wurde, bei der 12-stündigen Behandlung der Neuroblastomzellen mit 500 µM Flufenaminsäure auf ungefähr 250 % der Kontrolle zu (Abb. 3.41). Da die PDC-E2-mRNA-Expression unter Flufenaminsäure über einen Behandlungszeitraum von 8 h nur geringfügig und statistisch nicht signifikant zunahm, ist davon auszugehen, dass die Regulation von PDC-E2 in der Hauptsache nicht transkriptional, sondern eher (post-)translational verläuft (Abb. 3.42).

PDC-E2 ist neben den beiden anderen Untereinheiten Pyruvat-Dehydrogenase-Komponente E1 (PDC-E1) und Dihydrolipoamid-Dehydrogenase (PDC-E3) ein Enzym des mitochondrialen Pyruvat-Dehydrogenase-Komplexes (PDC). Dieser Enzym-Komplex katalysiert die oxidative Decarboxylierung von Pyruvat und die Übertragung des entstandenen Acetyl-Rests auf das Coenzym A (CoA) zu Acetyl-CoA. PDC-E2 kommt dabei die Funktion der Übertragung des Acetyl-Rests auf CoA zu. Das entstandene Acetyl-CoA geht wiederum in den Citratzyklus ein. PDC stellt damit die Verknüpfung von Glykolyse und Citratzyklus dar (Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, 2003).

PDC-E2 wird in der Literatur immer wieder im Zusammenhang mit der primären biliären Zirrhose (**p**rimä**r**y **b**iliary **c**irrhosis, PBC) erwähnt, einer langsamen progressiven Erkrankung der Leber, die durch eine chronische, nichteitrige destruierende Entzündung der Epithelzellen der kleineren intrahepatischen Gallengänge und durch hohe Titer an **a**nti-**m**itochondrialen IgG-Antikörpern (AMA) charakterisiert ist (Kaplan MM, 1996). Eine Reihe von Untersuchungen haben gezeigt, dass über 90 % der Patienten mit PBC spezifische Autoantikörper gegen PDC-E2 aufweisen (Gershwin ME, et al., 1987; Yeaman SJ, et al., 1988; Surh CD, et al., 1990; Caldwell SH, et al., 1992). PDC-E2 ist im Zusammenhang der PBC ein Autoantigen, das im Verlauf dieser Autoimmunerkrankung an der Oberfläche betroffener Epithelzellen erscheint (Joplin R, et al., 1992; Tsuneyama K, et al., 1995). Die Präsentation von Autoantigenen an der Zelloberfläche wird auch bei anderen

Autoimmunerkrankungen im Zusammenhang mit Apoptose gesehen (Casciola-Rosen LA, et al., 1994; Sapozhnikov AM, et al., 2002; Ohlsen M, et al., 2002). Da für PBC ebenfalls apoptotische Prozesse angenommen werden, haben P. Macdonald et al. die Expression von PDC an der Zelloberfläche apoptotischer Zellen von drei verschiedenen Zelllinien immunochemisch als eine mögliche Konsequenz der Induktion von Apoptose untersucht (Fox CK, et al., 2001; Graham AM, et al., 1998; Koga H, et al., 1997; Kuroki T, et al., 1996; Macdonald P, et al., 2004). Dabei wurden gereinigte anti-mitochondriale IgG-Antikörper (AMAs) von PBC-Patienten eingesetzt. Wie bereits erwähnt, sind diese Antikörper gegen die E2-Komponente von PDC als bekanntes Autoantigen gerichtet, so dass die für PDC beschriebenen Beobachtungen auf PDC-E2 übertragbar sind. Durch Behandlung der Zelllinien mit dem Apoptose-Induktor Staurosporin wurden deutlich apoptotische Effekte wie Aktivierung der Caspasen 3, 8 und 9 und die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom c beobachtet. Die Induktion der Apoptose bewirkte eine signifikante Zunahme des mitochondrialen PDC sowohl im Zytoplasma, als auch auf der Zelloberfläche. Dieser Effekt schien abhängig zu sein von der Aktivität der Caspase 3. P. Macdonald et al. beschreibt den Anstieg von PDC im Zytoplasma und auf der Zellmembran als Folge der eingeleiteten Apoptose, wobei die Konsequenz dieser Beobachtung unklar bleibt.

Es kann also vermutet werden, dass der im Rahmen dieser Arbeit analysierte Anstieg von PDC-E2 nach Behandlung der Neuroblastomzellen mit dem NSAR Flufenaminsäure ebenfalls im Zusammenhang mit der eingeleiteten Apoptose steht. Es bleibt jedoch weiter zu untersuchen, welche Auswirkungen dieser PDC-E2-Anstieg auf die Zellen hat.

4.2.7. *Regulation von Hsc70/54*

Ein Protein-Spot, der durch die Behandlung der Neuroblastomzellen mit dem NSAR Flufenaminsäure bei der differentiellen Proteomanalyse an Intensität verlor (Abb. 3.43), wurde mittels MALDI-TOF-Analyse und Datenbank-Recherchen zunächst als Hsc54, einer Variante des konstitutiv exprimierten „Heat shock cognate protein 70“ (Hsc70), identifiziert. Eindimensionale und zweidimensionale Western-Blot-Analysen mit einem monoklonalen Hsc70-Antikörper, der sowohl mit Hsc54, als auch mit Hsc70 reagierte, machten deutlich, dass nicht nur das als Hsc54 identifizierte Protein durch Flufenaminsäure reguliert wurde, sondern darüber hinaus noch mindestens zehn weitere Varianten oder Isoformen von Hsc70, die mit dem eingesetzten Antikörper reagierten. Auffällig war dabei, dass unter dem Einfluss von Flufenaminsäure nur für Hsc70 eine Zunahme beobachtet wurde. Alle anderen Varianten bzw. Isoformen mit geringerem Molekulargewicht wurden über einen Behandlungszeitraum von 12 Stunden zum Teil sehr deutlich herunter reguliert (Abb. 3.44 – 3.47).

Bei den Untersuchungen der Expression der mRNA von Hsc70 und Hsc54 mittels RT-PCR wurde nur Hsc70-mRNA nachgewiesen. Für Hsc54-mRNA war kein Signal zu ermitteln. Über den Zeitraum der Flufenaminsäure-Behandlung schwankten die Werte für die Hsc70-

mRNA-Expression zwar leicht, zeigten aber im Verhältnis zur Kontroll-Gruppe keine statistisch signifikanten Veränderungen (Abb. 3.49). Es ist also eher davon auszugehen, dass die detektierten Hsc70/54-Proteine durch Flufenaminsäure nicht transkriptional reguliert werden, sondern eher auf der Ebene der Proteinsynthese und durch post-translationale Modifikationen und Prozessierungen.

Hsc70 gehört zur Hsp70-Familie, wird aber im Gegensatz zu Hsp70, das in Zellen durch Stress induziert wird, konstitutiv exprimiert (Dworniczak B, Mirault ME, 1987). Es besitzt ATPase-Aktivität, fungiert als molekulares Chaperon und ist an verschiedenen zellulären Prozessen, wie die korrekte Faltung von neu synthetisierten Proteinen oder Translokationen, beteiligt. Hsc70 besteht aus drei Domänen: einer N-terminalen 44 kDa ATPase-Domäne, einer mittleren 18 kDa Protein bindenden Domäne und einer C-terminalen 10 kDa Domäne mit nicht klar definierter Funktion (Wang TF, et al., 1993; Tsai MY, Wang C, 1994; Freeman BC, et al., 1995; Hu SM, Wang C, 1996).

Hsc54 entsteht durch alternatives Spleißen der Hsc70-mRNA, wobei die herausgeschnittene RNA-Sequenz für einen Teil der Protein bindenden Region von Hsc70 kodiert und für einen Teil der C-terminalen Region unklarer Funktion. Hsc54 wurde bisher als einzige Variante von Hsc70 beschrieben (Tsukahara F, et al., 2000). Es fungiert als ein Inhibitor der Chaperon-Aktivität von Hsc70. Bei Untersuchungen der Lokalisation von Hsc54 wurde gezeigt, dass Hsc54 sowohl unter normalen Bedingungen, als auch nach Hitzeschock in der Hauptsache im Zytoplasma lokalisiert ist, während Hsc70 im Zytoplasma und im Zellkern zu finden ist und nach Hitzeschock im Kern akkumuliert (Tsukahara F, Maru Y, 2004).

Bei der MALDI-TOF-Analyse des als Hsc54 identifizierten Spots wurden Aminosäure-Sequenzen analysiert, die in Datenbanken nur für Hsc70 und Hsc54 beschrieben wurden. Aufgrund des Molekulargewichts wurde für den Protein-Spot Hsc54 als Identität angenommen. Durch die Reaktion mit dem Hsc70-Antikörper, der auch mit Hsc54 reagiert, wurde diese Annahme zwar zunächst bestätigt, jedoch konnte für Hsc54 keine mRNA nachgewiesen werden, so dass die Möglichkeit besteht, dass das als Hsc54 identifizierte Protein zwar in weiten Teilen mit dem in der Literatur beschriebenen Protein Hsc54 übereinstimmt, jedoch nicht durch alternatives Spleißen, sondern z. B. durch post-translationale Prozessierungen entstanden ist und daher dem in den oben erwähnten Arbeiten von F. Tsukahara et al. beschriebenen Hsc54 nicht vollends identisch ist. Es wäre also voreilig, aufgrund der Daten aus der Literatur über die Funktion dieses regulierten Proteins zu mutmaßen. Darüber hinaus wurden noch mindestens neun weitere Proteine mit Molekulargewichten zwischen ca. 30 und 55 kDa unter dem Einfluss von Flufenaminsäure herunter reguliert, die offensichtlich Varianten und Isoformen von Hsc70 oder Hsc54 sind, deren Funktionen und physiologische Regulationen aber völlig unklar sind.

Über Hsc70, das durch die Behandlung der Neuroblastomzellen mit Flufenaminsäure über 12 Stunden hoch reguliert wurde, ist viel geforscht worden. Jedoch findet man in der Literatur bezüglich des Zusammenhangs zwischen Hsc70 und Apoptose kein einheitliches Bild. Einige Untersuchungen deuten auf eine pro-apoptotische Wirkung hin, während andere Untersuchungen zeigen, dass Hsc70 hemmend auf den programmierten Zelltod wirkt.

So wurde in Ovarien und Embryonen ein weit höherer Gehalt an Hsc70 gefunden, als an Actin, Tubulin oder dem induzierbaren Hsp70 (Palter KB, et al., 1986). Diese Beobachtungen wurden bei Hühnerembryonen in Zusammenhang mit der Hemmung der Apoptose bei der embryonalen bzw. neuronalen Entwicklung von Embryonen gesehen, da eine Hemmung von Hsc70 oder ein geringer Hsc70-Gehalt mit einer deutlich erhöhten Apoptose-Rate verbunden war (de la Rosa EJ, et al., 1998; Rubio E, et al., 2002).

In einer anderen Arbeit wurde von D. D. Mosser et al. gezeigt, dass Zellen, die Hsp70 oder Hsc70 überexprimieren, vor Hitzeschock-induziertem Zelltod geschützt sind (Mosser DD, et al., 2000). Dieser Effekt schien im Zusammenhang mit der Hemmung der Aktivierung von Procaspase 3 und 9 und der Hemmung des JNK(c-Jun N-terminal kinase)-Signalwegs zu stehen.

Eine Reihe von Arbeiten beschäftigen sich mit der Interaktion von Hsc70 mit BAG-1 („Bcl-2-associated anthanogene-1“), einem anti-apoptotischen Protein aus der BAG-Familie, das neben anderen Reaktionspartnern einerseits Bindungspartner vom Apoptose-Inhibitor Bcl-2 ist und so das Überleben von Zellen fördert, und andererseits die Proteinkinase Raf-1, die über eine Phosphorylierungskaskade an der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und an Proliferation und Überleben von Zellen beteiligt ist, Ras-unabhängig aktiviert (Takayama S, et al., 1999; Wang HG, et al., 1996; Morrison DK, Cutler RE, 1997).

Durch die Reaktion mit Hsc70 hat BAG-1 sowohl Einfluss auf die ATPase-Aktivität, als auch auf die Chaperon-Aktivität von Hsc70. So hemmt BAG-1 einerseits die Hsc70-vermittelte Chaperonisierung von denaturiertem Protein, andererseits ist für die Bindung von BAG-1 an das anti-apoptotische Protein Bcl-2 ATPase-Aktivität nötig. Da weder BAG-1, noch Bcl-2 ATP binden oder hydrolysieren können, liegt die Annahme nahe, dass Hsc70 im Komplex mit BAG-1 und Bcl-2 diese Aufgabe übernimmt. Daher wird in verschiedenen Arbeiten diskutiert, dass Hsc70 durch die Bindung an BAG-1 und die Reaktion mit Bcl-2 anti-apoptotisch wirkt (Höhfeld J, Jentsch S, 1997; Takayama S, et al., 1997; Höhfeld J, 1998; Stuart JK, et al., 1998). Jedoch hat sich gezeigt, dass eine Überexpression von BAG-1 nicht alle Zellen vor Hitzeschock-induziertem Zelltod schützt, und zwar insbesondere solche Zellen nicht, die einen sehr hohen Gehalt an Hsp70, der induzierbaren Isoform von Hsc70, aufweisen (Takayama S, et al., 1997). Wie oben bereits erwähnt, wirkt BAG-1 über Bcl-2 nicht nur hemmend auf die Apoptose, sondern stimuliert über die Proteinkinase Raf-1 auch die Proliferation. Untersuchungen von J. Song et al. deuten auf eine weitere gegenläufige Wirkung von Hsp70 bzw. Hsc70 hin. So konnte gezeigt werden, dass Raf-1 und Hsp70 um die Bindung zu BAG-1 konkurrieren. Durch eine Überexpression von Hsp70 nach Hitzeschock wurde der BAG-1/Raf-1-Komplex durch BAG-1/Hsp70 ersetzt und gleichzeitig die DNA-Synthese eingestellt (Song J, et al., 2001). Da sich Hsp70 und Hsc70 sehr ähnlich sind und vorher beschriebene Beobachtungen auf beide Hsp70-Varianten zuträfen, wäre eine solche Reaktion auch bei einer Überexpression von Hsc70 denkbar, was sich wiederum mit den Ergebnissen dieser Arbeit decken würde.

Ein ähnlicher Mechanismus wird für die Interaktion von Hsc70 mit SODD („Silencer Of Death Domain“), einem Inhibitor der Selbst-Aggregation des 55 kDa Typ 1 TNF-Rezeptors

(TNFR-1), diskutiert (Miki K, Eddy EM, 2002). Wie im Zusammenhang mit Hsp75 bereits beschrieben (Kap. 4.2.1.), vermittelt TNF über TNFR-1 Zytotoxizität, die sich sowohl in nekrotischem, als auch apoptotischem Zelltod äußert (Vilček J, Lee TH, 1991). Die Initialisierung des intrazellulären Signaltransduktionswegs erfolgt über eine Trimerisierung von TNFR-1. Die Rezeptoren aggregieren auf der intrazellulären C-terminalen Seite (TNFR-1IC) im Bereich des Todes-Domäne. Diese Trimerisierung findet allerdings auch ohne den extrazellulären Liganden TNF als sogenannte Selbst-Aggregation statt (Song HY, et al., 1994; Boldin MP, et al., 1995). Mit SODD wurde ein Protein gefunden, das die intrinsische Aggregation der Rezeptoren und damit die spontane Signaltransduktion hemmt (Jiang Y, et al., 1999). SODD gehört wie BAG-1 zur BAG-Familie und besitzt die typische Protein bindende BAG-Domäne. Über diese Domäne bindet SODD wie auch BAG-1 an die ATPase-Domäne von Hsc70. Da Hsc70 und TNFR-1, der auch ATPase-Aktivität besitzt, um die Bindung an SODD konkurrieren, wird diskutiert, dass Hsc70 durch die Reaktion mit SODD dessen inhibierende Wirkung auf die Selbst-Aggregation von TNFR-1 aufhebt und so den TNFR-1 Signalweg zum apoptotischen bzw. nekrotischen Zelltod ermöglicht.

Es werden noch eine ganze Reihe anderer Mechanismen beschrieben, durch die Hsc70 Einfluss auf Zelltod oder –überleben nimmt. E. Y. Krynetski et al. hat einen Multiprotein-Komplex untersucht, der neben „High mobility group protein“ B1 und B2 (HMGB1, HMGB2), Protein-Disulfid-Isomerase Erp60 und Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase auch Hsc70 enthält und DNA gegenüber zytotoxisch wirksamen Nukleosid-Analoga sensitiviert (Krynetski EY, et al., 2003).

Dagegen hat S. G. Ahn et al. herausgefunden, dass Hsc70 für die Regulation des „Heat shock factors 1“ (HSF1) notwendig ist (Ahn SG, et al., 2005). Bei einer Hemmung von Hsc70 war die Aktivität von HSF1 stark erniedrigt, was zu einer Reduktion der Expression HSF1-abhängiger Gene führte. Und schließlich war durch das Fehlen von Hsc70 verstärkt Stress-induziert Apoptose zu beobachten. Jedoch wurde im Zusammenhang mit der Regulation von TRAP1/Hsp75 unter dem Einfluss von Apoptose induzierenden Wirkstoffen ebenfalls von einer Aktivierung von HSF1 berichtet, gefolgt allerdings von einer Suppression von Hsp70, der vermehrten Expression von TRAP1/Hsp75 und einer Aktivierung des JNK/SAPK(c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase)-Signalwegs (siehe Kap. 4.2.1.).

Erst vor kurzer Zeit wurde ein etwas überraschender Mechanismus beschrieben, durch den der zytotoxische Effekt einer Überexpression von Hsp70 bzw. Hsc70 erklärt werden könnte. Dieser Mechanismus scheint mit der Beobachtung zusammenzuhängen, dass Hsp70 und Hsc70 mit Lipiden interagieren, sich in Membranen integrieren und Ionenkanäle bilden können (Arispe N, De Maio, 2000). So zeigten Hsp70 und Hsc70 eine stark selektive Interaktion mit Phosphatidylserin (PS) auf der Zellmembran, gefolgt von einer schnellen Inkorporation in den Lipid-Bilayer (Arispe N, et al., 2004). Extrazellulär gegebenes Hsp70 oder Hsc70 bewirkte bei Zellen mit PS auf der Zelloberfläche einen deutlich zytotoxischen Effekt. Dieser Effekt war bei Hsc70 stärker ausgeprägt, als bei Hsp70. Da PS auf der Zelloberfläche ein früher Marker apoptotischer Prozesse ist, ist es möglich, dass extrazelluläres Hsc70 auf die beschriebene Weise die Apoptose begünstigt. Dass Hsps auch

extrazellulär anzutreffen sind, zeigen Untersuchungen, die Hsp70, Hsc70 und auch Hsc54 auf der Zelloberfläche von Tumorzellen nachwiesen (Multhoff G, et al., 1995; Shin BK, et al., 2003).

Zuletzt soll noch kurz erwähnt werden, dass Hsc70 über Glucocorticoid-Rezeptoren Apoptose induzieren kann. So wurde von T. Rajapandi et al. gezeigt, dass für die Aktivierung von Glucocorticoid-Rezeptoren die Anwesenheit von Hsc70 nötig ist (Rajapandi T, et al., 2000). Da für Glucocorticoide wiederum beschrieben wurde, dass sie bei normalen wie leukämischen Lymphozyten die Apoptose einleiten, könnte Hsc70 auch über den Glucocorticoid-Weg an apoptotischen Prozessen beteiligt sein (Distelhorst CW, 2002).

Aus der Vielzahl der beschriebenen Mechanismen wird deutlich, dass die Funktionen von Hsc70 sehr vielschichtig und zum Teil nicht miteinander vereinbar scheinen, da Hsc70 sowohl pro-, als auch anti-apoptotische Wirkungen zeigt. Es bleibt zu untersuchen, ob die Hochregulation von Hsc70 der Versuch einer zellprotektiven Reaktion der Zellen auf den durch Flufenaminsäure ausgelösten Stress ist, oder ob Hsc70 im Zusammenhang mit den beobachteten apoptotischen Prozessen hoch reguliert wird. Dabei wäre noch weiter zu untersuchen, ob und an welchen der oben beschriebenen Mechanismen Hsc70 im Zusammenhang mit der Wirkung von Flufenaminsäure beteiligt ist.

Eine Hochregulation von Hsc70 wurde auch bei der Behandlung von HL60-Zellen mit dem Apoptose induzierenden Zytostatikum Etoposid beobachtet (Lin JM, et al., 2001). Allerdings wurde dieser Effekt mit der Zellprotektion gegenüber dem ausgelösten Zellstress erklärt.

Das Ergebnis dieser Arbeit ist nicht der erste Hinweis auf die Wirkung von NSAR auf Hsc70. Auch L. Lagunas et al. beschreibt den Einfluss von Ibuprofen und Indomethacin auf Hsc70 (Lagunas L, et al., 2004). Bei NSAR-Konzentrationen, die um ein mehrfaches höher waren, als sie für die Hemmung der Cyclooxygenasen nötig gewesen wären, wurde eine Translokation von Hsc70 vom Zytoplasma in den Zellkern beobachtet, verbunden mit einer vermehrten DNA-Bindungsaktivität von HSF.

Die Funktionen und genauen Identitäten der Hsc70/54-Isoformen mit geringeren Molekulargewichten, die unter Flufenaminsäure-Behandlung herunter reguliert wurden, bleiben unklar und müssen in weiteren Versuchen untersucht werden.

4.2.8. *Regulation von Enolase-1, alpha (Eno-1)*

Ein anderer der sechs Protein-Spots, die bei den Proteomanalysen unter dem Einfluss von Flufenaminsäure an Intensität einbüßten, wurde mittels MALDI-TOF-Analysen und Datenbank-Recherchen als Enolase-1, alpha (Eno-1) identifiziert.

Enolase ist ein Enzym der Glykolyse bzw. der Gluconeogenese. Es katalysiert unter Abspaltung von Wasser die reversible Reaktion von 2-Phosphoglycerat zu Phosphoenolpyruvat (Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, 2003). Phosphoenolpyruvat ist das Substrat der Pyruvat-Kinase, das Enzym der zweiten ATP-gewinnenden Reaktion der Glykolyse zu Pyruvat (Kap. 3.6.3.4. und 4.2.10.).

Enolase-Moleküle treten als Dimere auf. Dabei gibt es drei verschiedene durch separate Gene kodierte Enolase-Subtypen, aus denen diese Dimeren zusammengesetzt sein können: Enolase-1 (alpha, α), Enolase-2 (gamma, γ) und Enolase-3 (beta, β). $\alpha\alpha$ -Isoenzyme kommen in allen fetalen und in den meisten Geweben erwachsener Säuger vor, während $\beta\beta$ - und $\gamma\beta$ -Enolase hauptsächlich in Skelett- und Herz-Muskeln gefunden werden. Dagegen trifft man $\gamma\gamma$ - und $\alpha\gamma$ -Enolase vor allem in Nervengewebe und in Geweben mit neuroendokrinen Zellen an (Schmechel D, et al., 1978; Kato K, et al., 1983; Haimoto J, et al., 1985). Diese Isoformen werden häufig als Neuron-spezifische Enolase (NSE) bezeichnet, während α -Enolase (Eno-1) auch nicht-neuronale Enolase (NNE) genannt wird.

Die Zuordnungen der Enolase-Isoformen zu den verschiedenen Zell- bzw. Gewebearten beziehen sich jedoch nur auf ausdifferenzierte Zellen. So werden Skelett-Muskelzellen erst mit der Entwicklung und Differenzierung von α - auf β -Enolase umgestellt, während Neuronen bei ihrer Differenzierung von α - auf γ -Enolase wechseln (Fletcher L, et al., 1978; Schmechel DE, et al., 1980). Welche Enolase in einer Zellart exprimiert wird, scheint also auch vom Differenzierungsgrad der Zellen abhängig zu sein. Da Neuroblastomzellen noch relativ undifferenzierte Zellen sind, kann vermutet werden, dass als Enolase nur oder hauptsächlich α -Enolase (Eno-1) exprimiert wird.

Der unter Flufenaminsäure-Behandlung regulierte Eno-1-Protein-Spot wurde bei der 2D-SDS-PAGE bei ca. 37 kDa und einem pI von 5,35 aufgetrennt. In der Literatur findet man für Eno-1 jedoch ein Molekulargewicht von 47 kDa bei einem pI von 7,4 (Mohammad RM, et al., 1994). Allerdings wird in einer Arbeit von S. Feo et al. auch eine Isoform von Eno-1 beschrieben, die ein Molekulargewicht von 37 kDa hat (Feo S, et al., 2000). Jedoch führt S. Feo et al. diese leichtere Isoform auf alternative Translation zurück, da die mRNA für Eno-1 innerhalb der RNA-Sequenz ein weiteres AUG-(Start)Codon für Met-97 aufweist, so dass diese Eno-1-Isoform N-terminal um 96 Aminosäuren verkürzt ist. Diese Isoform scheint den c-myc-P2-Promoter negativ zu regulieren, so dass diskutiert wird, ob sie als Tumorsuppressor fungiert. Eine solche Funktion passt allerdings nicht zu den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit, da hier 37 kDa schwere Eno-1 parallel zu apoptotischen Prozessen herunter reguliert wurde.

Tatsächlich deuteten die Ergebnisse der MALDI-TOF-Analyse jedoch eher eine C-terminale Verkürzung von Eno-1 an, da kein durch Trypsin abgespaltenes Peptid vom C-terminalen Drittel der Aminosäuresequenz von Eno-1 nachweisbar war. Dagegen waren die analysierten Proteinbruchstücke relativ gleichmäßig über zwei Drittel der N-terminalen Eno-1-Proteinsequenz verteilt (Abb. 3.51).

Auch durch die nachfolgenden Western-Blot-Analysen scheint sich eine C-terminale Verkürzung von Eno-1 zu bestätigen, da ein polyklonaler Antikörper eingesetzt wurde, der mit einer Aminosäuresequenz nahe dem C-Terminus von Eno-1 reagierte. Es ist daher zu vermuten, dass aufgrund dieser fehlenden C-terminalen Sequenz weder in den zweidimensionalen noch eindimensionalen Western-Blot-Analysen ein Signal für das 37 kDa schwere Eno-1 zu detektieren war. Es besteht daher Grund zur Annahme, dass es sich um eine andere Eno-1-Isoform handelt, als die bei S. Feo et al. beschriebene.

Der eingesetzte Antikörper war gegenüber allen drei bekannten Enolase-Subtypen reaktiv, so dass nicht nur α -Enolase (Eno-1), sondern auch etwaige γ -Enolase (Eno-2) bei den Versuchen miterfasst werden konnte. Bei den eindimensionalen Western-Blot-Analysen war wie zu erwarten eine deutliche Bande bei ca. 47 kDa zu detektieren, wodurch gezeigt werden konnte, dass in den Neuroblastomzellen neben der 37 kDa Isoform von Eno-1 auch die in der Literatur bereits gut beschriebene 47 kDa α -Enolase (Eno-1) exprimiert wird. Darüber hinaus zeigten diese Banden für 47 kDa Eno-1 eine statistisch signifikante Abnahme der Intensität nach 12-stündiger Behandlung der Zellen mit Flufenaminsäure (Abb. 3.52). Die Veränderungen auf Protein-Ebene spiegeln sich allerdings nicht auf der Ebene der mRNA wieder. Bei semiquantitativen Untersuchungen der Expression von Eno-1-mRNA unter dem Einfluss von Flufenaminsäure waren über einen Behandlungszeitraum von 8 h keine statistisch signifikanten Änderungen zu analysieren (Abb. 3.53). Die beobachteten Effekte scheinen also nicht über eine veränderte Transkription, sondern translational und/oder post-translational reguliert zu werden.

Ein Zusammenhang zwischen Enolase und entartetem Gewebe ist bereits häufig beschrieben worden und seit langem bekannt. Schon in den 80er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wurden in Geweben verschiedener Tumoren und im Serum bzw. Plasma von Patienten mit unterschiedlichen soliden Tumoren hauptsächlich erhöhte Eno-1-Konzentrationen gemessen. Aber auch erhöhte Werte für β - und γ -Enolase (Eno-3 und Eno-2) wurden gefunden (Gerbitz KD, et al., 1986; Oka K, et al., 1989). Darüber hinaus war zum Teil auch ein Rückgang der jeweiligen Enolase-Isoform unter Behandlung oder bei ischämischen und nekrotischen Prozessen zu beobachten (Royds JA, et al., 1982; Ishiguro Y, et al., 1984).

Gerade in jüngerer Zeit wurde bei vielen verschiedenen Krebsarten eine erhöhte Eno-1-Konzentration gefunden. So wurde 2004 von B. Altenberg und K. O. Greulich veröffentlicht, dass bei 24 verschiedenen Krebsarten, die über 70 % aller weltweiten Krebserkrankungen repräsentieren, die Gene der Glykolyse, insbesondere auch von Eno-1, aber auch von Pyruvat-Kinase M2 (PK-M2, Kap. 3.6.3.4. und 4.2.10.), überexprimiert werden (Altenberg B, Greulich KO, 2004). Andere Arbeiten, die sich mit bestimmten Tumoren beschäftigen, bestätigten diese Beobachtungen. So hat man beim Mamma-Karzinom ebenfalls erhöhte Eno-1-Werte bzw. -Aktivität gefunden. Dabei scheint dieser Effekt bei Östrogen/Progesteron-Rezeptor-negativen und HER-2/neu-positiven Mamma-Karzinomen am deutlichsten zu sein (Durany N, et al., 2000; Somiari RI, et al., 2003; Zhang DH, et al., 2005). Auch bei Kopf-Hals-Tumorzellen, nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, Pankreaskarzinomen und Hepatitis C-vermittelten hepatozellulären Karzinomen wurden erhöhte Eno-1-Konzentrationen beobachtet (Wu W, et al., 2002; Li LS, et al., 2004; Shen J, et al., 2004; Takashima M, et al., 2005). Eine weitere Arbeit zeigt einen Zusammenhang zwischen einer erworbenen Cisplatin-Resistenz bei einer Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinie und der erhöhten Expression verschiedener Proteine, unter anderen auch Eno-1 (Johnsson A, et al., 2000).

Keine dieser Arbeiten beschreibt einen Mechanismus, über den Eno-1 an Entstehung und Wachstum von Tumoren beteiligt sein könnte. Jedoch ist allein die Gesamtaussage der oben zitierten Arbeiten interessant, da in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, dass die

47 kDa Enolase, und zwar mit hoher Wahrscheinlichkeit Eno-1, unter dem Einfluss eines Apoptose induzierenden Wirkstoffs in Neuroblastomzellen herunter reguliert wurde. Es bleibt daher zu untersuchen, ob Enolase bzw. Eno-1 an Apoptose hemmenden oder Proliferation fördernden Mechanismen beteiligt ist, oder ob die Abnahme von Eno-1 lediglich diagnostisch zu bewerten ist.

Eine Arbeit beschreibt den möglichen Einfluss von Eno-1 auf Mechanismen der Proliferation, da bei proliferierenden Chondrozyten eine verstärkte Expression von Eno-1-mRNA zu beobachten war (Wang Y, et al., 2004). In einer anderen Arbeit wird Eno-1 eine Rolle bei der transkriptionalen Regulation zugeschrieben (Kim JW, Dang CV, 2005). Während eine weitere Veröffentlichung am Beispiel des diffusen großzelligen Lymphoms (DLCL) für Eno-1 eine Funktion in der Differenzierung von Zellen nahe legt (Mohammad RM, et al., 1994).

Nur eine Arbeit erwähnt Eno-1 im Zusammenhang mit Apoptose. So war bei HL60-Zellen, die aufgrund von photodynamischer Therapie (PDT) Apoptose einleiteten, eine Carbonylierung von verschiedenen Proteinen, unter anderen auch von Eno-1 zu beobachten. Die Autoren stellten dabei die Hypothese auf, dass diese Carbonylierung einen „Signal-Mechanismus“ für die Apoptose darstellt (Magi B, et al., 2004).

Durch die negative Regulation von Eno-1 und der entdeckten 37 kDa schweren Isoform unter dem Einfluss von Flufenaminsäure ist ein Hinweis gegeben, dass Eno-1 an der positiven Wirkung von NSAR auf die Apoptose beteiligt ist. Diese Annahme muss jedoch durch weitere Versuche bestätigt werden. Mögliche Mechanismen sind dabei noch zu untersuchen.

4.2.9. Regulation von TCP-1 ϵ (T-complex protein 1, epsilon)

Unter den sechs Proteinen, die durch die differentielle Proteomanalyse zur Wirkung des NSAR Flufenaminsäure auf Neuroblastomzellen der Zelllinie KELLY als solche identifiziert wurden, die unter der Behandlung mit diesem Wirkstoff herunter reguliert wurden, befand sich auch TCP-1 ϵ (Abb. 3.54). Dieses Protein ist eine Untereinheit eines Heterooligo-Protein-Komplexes, der CCT (Chaperonin-containing TCP-1) genannt wird. Dieser Komplex setzt sich aus 6 bis 9 verschiedenen Subtypen (alpha, beta, gamma, delta, epsilon, zeta, eta und theta) zusammen, die durch unterschiedliche Gene codiert werden und nur zu 25 – 36 % untereinander identisch sind (Kubota H, et al., 1994).

CCT fungiert im Cytosol als ein oligomeres molekulares Chaperon, das in Abhängigkeit von ATP insbesondere an der korrekten Faltung von neu synthetisiertem α - und β -Tubulin und von denaturiertem β -Actin beteiligt ist (Lewis VA, et al., 1992; Yaffe MB, et al., 1992; Gao Y, et al., 1992). CCT ist daher entscheidend wichtig für den Aufbau und Erhalt des Zytoskeletts. CCT unterscheidet sich von anderen molekularen Chaperonen, wie z. B. Hsp70, dessen konstitutiv exprimierte Isoform Hsc70 auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifiziert wurde (Kap. 3.6.3.1. und Kap. 4.2.7.), nicht nur darin, dass es aus 6 bis 9

unterschiedlichen Subtypen zusammengesetzt ist, sondern auch darin, dass es durch Hitzeschock nicht induzierbar ist.

Eine Untereinheit dieses oligomeren Chaperons, TCP-1 ϵ , wurde nun unter dem Einfluss des NSAR Flufenaminsäure parallel zu apoptotischen Vorgängen herunter reguliert (Abb. 3.54). Da jedoch die Expression der mRNA von TCP-1 ϵ über den Behandlungszeitraum von 8 h keine statistisch signifikanten Veränderungen zeigte (Abb. 3.55), ist davon auszugehen, dass die beschriebene Regulation von TCP-1 ϵ nicht auf eine Hemmung der Transkription zurück geführt werden kann. Es kann eher angenommen werden, dass die negative Regulation von TCP-1 ϵ auf einer Änderung der Translation oder auf einer post-translationalen Modifikation oder proteolytischen Spaltung von TCP-1 ϵ beruht.

Über einen Zusammenhang von TCP-1 ϵ und Apoptose ist nur wenig bekannt. In einer Arbeit über differentiell exprimierte molekulare Chaperone in verschiedenen Arealen des Gehirns von Patienten mit Down-Syndrom wurde jedoch ein Zusammenhang zwischen herunter reguliertem TCP-1 ϵ und apoptotischen Vorgängen gesehen (Yoo BC, et al., 2001). Ein Down-Syndrom ist im Erwachsenenalter ähnlich wie die Alzheimer Krankheit durch einen pathologischen Verlust von Neuronen im Hirn gekennzeichnet. Dieser Untergang neuronalen Gewebes wird durch apoptotische Prozesse vermittelt. Im parietalen Kortex erwachsener Down-Syndrom-Patienten konnte statistisch signifikant ($p \leq 0,05$) eine Abnahme von TCP-1 ϵ nachgewiesen werden. Da TCP-1 ϵ als Untereinheit von CCT auch am Wachstum der Mikrotubuli beteiligt ist, und weil für Down-Syndrom-Neurone ein Anhalten des Zellzyklus in der G₂/M-Phase mit nachfolgender Apoptose diskutiert wird, wird angenommen, dass durch die Abnahme von TCP-1 ϵ über die Hemmung des Zellzyklus in der G₂/M-Phase die Apoptose vermittelt wird (Nagy Z, 1999; Ditmar G, et al., 1997).

Tatsächlich war bei den FACS-Analysen für die Konzentrationen von 500 und 1000 μ M Flufenaminsäure nach 6 h, 9 h und 12 h eine erhöhte Anzahl von Zellen in der G₂/M-Phase zu beobachten (Abb. 3.14 – 3.16 und 3.18).

Der Zusammenhang zwischen TCP-1 ϵ und NSAR-vermittelter Apoptose bleibt jedoch weiter zu untersuchen.

4.2.10. Regulation der Pyruvat-Kinase, Isoform M1 oder M2 (PK-M1/M2)

Mittels der Proteomanalyse wurde neben der α -Enolase (Enolase-1, Eno-1) ein weiteres bedeutendes Protein der Glykolyse identifiziert, das unter dem Einfluss von Flufenaminsäure herunter reguliert wurde (Abb. 3.56), Pyruvat-Kinase M1 (PK-M1) oder M2 (PK-M2). Die identifizierten Protein-Fragmente konnten zu beiden Isoformen gehören, die sich nur geringfügig voneinander unterscheiden (Abb. 3.57).

Die Pyruvat-Kinase katalysiert bei der Glykolyse im Anschluss an die Enolase den nächsten Schritt von Phosphoenolpyruvat zu Pyruvat (Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, 2003). Bei dieser Reaktion wird ein Molekül ATP gewonnen. Es ist ein Enzym der Energiegewinnung.

In differenzierten Geweben sind ähnlich wie bei der Enolase unterschiedliche Pyruvat-Kinasen zu finden. PK-M1 ist charakteristisch für Gewebe mit hohem Energieumsatz wie Muskeln oder Gehirn. Die Isoform PK-L wird in Organen mit starker Gluconeogenese wie Leber und Niere exprimiert, während PK-R in Erythrozyten gebildet wird. PK-M2 wird als einzige Pyruvat-Kinase in frühen fetalen Geweben gebildet und erst während der Entwicklung graduell durch die gewebetypischen Isoformen ersetzt (Yamada K, Noguchi T, 1999).

Während der Tumorgenese verschwinden im allgemeinen die gewebespezifischen PK-Isoformen und PK-M2 wird verstärkt exprimiert (Yamada K, Noguchi T, 1995). Daher wird diese PK-Isoform auch tumorspezifische Pyruvat-Kinase genannt.

Da die untersuchten Zellen einer Neuroblastom-Zelllinie angehören und somit entartete Zellen darstellen, wurde davon ausgegangen, dass es sich bei dem betreffenden Protein um eine Form der tumorspezifischen PK-M2-Isoform handelt. Jedoch scheint diese Form C-terminal um eine bestimmte Aminosäuresequenz verkürzt zu sein, da das Molekulargewicht mit 38 kDa ca. 20 kDa leichter ist, als die in der Literatur beschriebene Isoform, und da die durch MALDI-TOF analysierten PK-M2-Fragmente N-terminal nur über knapp zwei Drittel der Aminosäuresequenz verteilt sind (Abb. 3.57).

Da die mRNA von PK-M2 durch die Behandlung der Neuroblastomzellen mit Flufenaminsäure keine statistisch signifikanten Veränderungen aufweist, ist anzunehmen, dass die vorliegende PK-M2-Isoform translational oder post-translational durch Prozessierungen und Modifikationen reguliert wird. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die als PK-M2 identifizierte Isoform durch alternatives Spleißen entsteht. Um das jedoch weiter untersuchen zu können, muss genau bekannt sein, welche Aminosäuresequenz fehlt, um entsprechende Primer entwickeln zu können.

Wie bereits erwähnt, wird die PK-M2-Isoform spezifisch in entartetem Gewebe exprimiert. Daher wurde PK-M2 mittlerweile bei einer Reihe von verschiedenen Tumoren, wie zum Beispiel bei Nierenkarzinomen, gastrointestinalen Tumoren, Bronchialkarzinomen oder Melanomen, um nur einige zu nennen, als diagnostischer Tumormarker untersucht (Oremek GM, et al., 2000; Hardt PD, et al., 2000; Schneider J, et al., 2003; Roigas J, et al., 2003; Zhang B, et al., 2004; Ventrucchi M, et al., 2004; Koss K, et al., 2004; Ugurel S, et al., 2005). Es ist auffällig, dass die Pyruvat-Kinase, wie auch schon für Eno-1 beschrieben, in einem Großteil der Krebsarten überexprimiert wird (Altenberg B, Greulich KO, 2004). Außerdem ist schon seit langem bekannt, dass die glykolytische Aktivität in stark proliferierenden Zellen generell höher ist, als in normalen Zellen (Warburg O, 1956). Ob dieses Wissen nur diagnostische Relevanz besitzt, oder ob eine Hemmung von Enzymen der Glykolyse, wie Eno-1 oder in diesem Fall PK-M2, auch therapeutischen Nutzen haben könnte, muss noch weiter untersucht werden.

Durch S. Takeda et al. wurde bereits der hemmende Effekt von zyklischem Polylactat (CPL, **cyclic polylactate**) auf die anaerobe Glykolyse beschrieben (Takeda S, et al., 1997). CPL hemmte dabei die Aktivität der Pyruvat-Kinase und Laktatdehydrogenase von FM3A-Tumorzellen und bewirkte dadurch eine Wachstumshemmung.

Auch J. D. Dombrauckas et al. sieht in der PK-M2-Isoform ein wichtiges molekulares Target zur Untersuchung von Struktur und Regulation für die Entwicklung von gegen Krebs gerichteten Wirkstoffen (Dombrauckas JD, et al., 2005).

Ob im Zusammenhang der vorliegenden Arbeit die Abnahme der verkürzten Isoform von PK-M2 als Tumormarker nur eine Aussage über die anti-proliferative oder apoptotische Wirksamkeit des NSAR Flufenaminsäure macht, oder ob PK-M2 mechanistischer Bestandteil dieser Wirkung ist, bleibt weiter zu untersuchen.

4.2.11. Regulation des eukaryotischen Elongationsfaktors 2 (eEF2)

Bei der Proteomanalyse zur Wirkung des NSAR Flufenaminsäure auf die Protein-Expression der Neuroblaston-Zelllinie KELLY nahm ein Protein-Spot bei einer Behandlungszeit von 12 h sogar auf unter 5 % der Kontrolle ab (Abb. 3.59). Dieser Spot wurde als eukaryotischer Elongationsfaktor 2 (eEF2) identifiziert. Es scheint sich dabei jedoch um eine Isoform von eEF2 zu handeln, da das Molekulargewicht mit ca. 41 kDa weniger als die Hälfte des in der Literatur beschriebenen Molekulargewichts für eEF2 von 94 kDa ausmacht. Diese Annahme wird dadurch erhärtet, dass bis auf eines alle durch die MALDI-TOF-Analyse identifizierten eEF2-Protein-Fragmente aus der N-terminalen Hälfte der eEF2-Aminosäuresequenz stammten (Abb. 3.60).

Es bleibt zu untersuchen, ob diese verkürzte Form von eEF2 aufgrund von alternativem Spleißen oder durch post-translationale proteolytische Prozessierungen entstanden ist. Da jedoch durch die MALDI-TOF-Analyse auch das 13 Aminosäuren lange C-terminale eEF2-Fragment identifiziert wurde (Abb. 3.60), ist die Bildung des 41 kDa eEF2 durch alternatives Spleißen am sinnvollsten erklärt. Die Untersuchung des Gehalts der mRNA von eEF2 ergab über eine Behandlungszeit von 8 h jedoch keine signifikanten Veränderungen (Abb. 3.62).

Weiterhin bleibt zu klären, ob 41 kDa eEF2 ähnliche Funktionen hat wie das bereits gut untersuchte 94 kDa schwere Protein eEF2, oder ob sich die Funktionen zum Teil oder völlig voneinander unterscheiden.

Die vorliegende Arbeit legt jedoch in jedem Fall einen Zusammenhang zwischen der Abnahme von 41 kDa eEF2 und der durch ein NSAR eingeleiteten Apoptose nahe.

Die Funktion vom 94 kDa eEF2 liegt zusammen mit weiteren Faktoren, wie eEF1A und eEF1B-Subtypen, bei der Regulation der Translation und Elongation von Proteinen (Browne GJ, Proud CG, 2002). eEF2 kommt dabei die Funktion der Vermittlung der Translokation von tRNA und mRNA innerhalb des Ribosoms zu. Dieser Prozess ist eine GTP-abhängige Reaktion. Die GTP-Bindungsdomäne befindet sich in der Nähe des N-Terminus, einer Region, die scheinbar auch an der Bindung an die Ribosomen beteiligt ist. In diesem Abschnitt befindet sich ebenfalls die Phosphorylierungsstelle Thr56 bzw. Thr45, durch deren Phosphorylierung eEF2 deaktiviert wird (Ovchinnikov LP, et al., 1990; Price NT, et al., 1991; Ryazanov AG, Davydova EK, 1989; Redpath NT, et al., 1993).

Die Abnahme des 41 kDa eEF2-Spots könnte daher auch die Folge einer Phosphorylierungsreaktion sein, da die für die Deaktivierung interessante Phosphorylierungsstelle Thr45 auf dem eindeutig identifizierten Proteinabschnitt von eEF2 liegt. Berechnet man mithilfe des „Scansite Molecular Weight & Isoelectric Point Calculators“ (http://scansite.mit.edu/calc_mw_pi.html) die Veränderung des pI-Wertes von eEF2, so ergibt sich, dass sich durch eine Phosphorylierung der pI-Wert von eEF2 um ca. 0,1 zum Sauren verschiebt. Tatsächlich war bei der Proteomanalyse im Abstand von ΔpI 0,1 hin zum Sauren ein Protein-Spot zu beobachten, der unter dem Einfluss von Flufenaminsäure über die Behandlungszeit von 12 h parallel zur Abnahme des identifizierten eEF2-Spot an Intensität zunahm (Abb. 3.61). Da, wie gesagt, aus der Literatur bekannt ist, dass durch eine Phosphorylierung an Thr56 bzw. Thr45 eEF2 deaktiviert wird (Browne GJ, Proud CG, 2002), könnte es sich bei dem besagten Protein-Spot um die phosphorylierte Form der 41 kDa eEF2-Isoform handeln. Diese Annahme sollte jedoch durch weitere massenspektrometrische Analysen oder Sequenzierungen untersucht werden.

Es sind bisher nur wenige Arbeiten veröffentlicht worden, die einen Zusammenhang zwischen eEF2 und entartetem Gewebe bzw. Tumorzellen beschreiben. So untersuchten A. C. Bergman et al. 1999 die Wirkung der Hemmung des durch Onkogene vermittelten Signaltransduktionswegs der Proteinkinasen Raf – MEK – ERK (**R**as-**a**ctivated **f**actor, **MAP/ERK-kinase**, **e**xtracellular signal-**r**egulated **k**inase), wodurch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren ausblieb, die für die Steigerung der Proliferation der Zellen und für die Hemmung der Apoptose zuständig sind (Lewis TS, et al., 1998). Durch den Einsatz eines MEK1-Inhibitors (PD98059) wurde neben anderen Proteinen die Expression von eEF2, aber auch von Eno-1 (Kap. 3.6.3.2. und 4.2.8.) gehemmt (Bergman AC, et al., 1999).

In einer anderen Arbeit wurde ein Farnesyltransferase-Inhibitor (FTI) gegen Zellen eines Kopf-Hals-Karzinoms eingesetzt. Dieser FTI (SCH66336) hatte schon in anderen Untersuchungen seine antitumorale Aktivität unter Beweis gestellt (Njoroge FG, et al., 1998; Feldkamp MM, et al., 2001). H. Ren et al. konnte zeigen, dass schon nach 3 h Behandlung mit SCH66336 die Phosphorylierung und damit Deaktivierung von eEF2 in den Tumorzellen, die eine Mutation des Ras-Onkogens aufwiesen, einsetzte (Ren H, et al., 2005). Daraufhin war die Proteinsynthese in den Zellen reduziert. Diese Effekte schienen unabhängig vom Ras- bzw. Raf-MEK-ERK-Signalweg zu sein.

Die erwähnten Arbeiten deuten einen Einfluss von eEF2 auf die Überlebensfähigkeit von entarteten Zellen an. Oder anders ausgedrückt könnte die Deaktivierung oder Abnahme von eEF2 mit einer verminderten Proliferation oder sogar mit der Einleitung der Apoptose einhergehen. Geht man bei dem 41 kDa schweren eEF2 von ähnlichen Funktionen aus, passen diese Annahmen ins Bild dieser Arbeit, da 41 kDa eEF2 parallel zu apoptotischen Prozessen herab reguliert bzw. deaktiviert wurde.

Zur Bestätigung der beschriebenen Hypothesen müssen jedoch noch weitere Untersuchungen folgen.

4.2.12. *Regulation von sEF2b (similar to elongation factor 2b)*

Interessanterweise wurde bei den Untersuchungen der Proteinexpression nach Behandlung der Neuroblastomzellen mit dem NSAR Flufenaminsäure ein weiteres Protein entdeckt, das wie die 41 kDa-Form von eEF2 ein Produkt der eEF2-mRNA ist und ebenfalls herunter reguliert wird (Abb. 3.63). Weil es eEF2 ähnlich ist, wird es „Similar to elongation factor 2b“ (sEF2b) genannt. Die in der NCBI-Datenbank angegebene Aminosäuresequenz für sEF2b entspricht ab Arg330 der von eEF2 (Abb. 3.64). Dabei ist Arg330 C-terminal die erste Aminosäure von sEF2b, so dass es das Produkt einer post-translationalen proteolytischen Spaltung von eEF2 zu sein scheint.

Möglich wäre jedoch auch, dass die gefundene sEF2b-Form das Produkt einer alternativen Translation durch Initiation an einem internen AUG-Codon auf der mRNA ist. Methionin wird nur durch die Nukleotidsequenz AUG codiert. Vor dem ersten durch MALDI-TOF identifizierten sEF2b-Protein-Fragment befinden sich auf der mRNA fünf AUG-Codons, die eigentlich für Methionin codieren, aber auch für eine interne Initiation der Translation als Start-Codon infrage kommen könnten (Abb. 3.64).

In jedem Fall ist eine transkriptionale Regulation von sEF2b ausgeschlossen, da bei den RT-PCR-Analysen für eEF2 keine statistisch signifikanten Veränderungen der eEF2-mRNA durch die Behandlung mit Flufenaminsäure nachweisbar waren (Abb. 3.62).

Da die für die Aktivierung bzw. Deaktivierung von eEF2 wichtige Phosphorylierungsstelle, die GTP-Bindungsdomäne und die Region, die für die Bindung an die Ribosomen wichtig ist, auf der N-terminalen Seite von eEF2 liegen, die bei sEF2b fehlt, ist davon auszugehen, dass sEF2b eine andere Funktion zukommt als eEF2 oder der identifizierten 41 kDa Isoform von eEF2. Welche Funktionen das sein könnten, ist leider aus der Literatur nicht abzuleiten.

Sicher ist aufgrund der vorliegenden Arbeit jedoch, dass sEF2b parallel zu apoptotischen Prozessen, die durch Flufenaminsäure eingeleitet wurden, herunter reguliert wird. Ob dieser Beobachtung ein Mechanismus zugrunde liegt, oder ob sie als Artefakt zu bewerten ist, kann an dieser Stelle leider nicht geklärt werden.

5. Zusammenfassung

In vielen epidemiologischen und Placebo-kontrollierten randomisierten Studien, in unterschiedlichsten Tier- und Zell-Modellen wurde bereits die Tumorgenese-hemmende und Apoptose-induzierende Wirkung der Wirkstoffklasse der NSAR belegt. Dabei wurden und werden verschiedene Mechanismen, die im Zusammenhang mit der Hemmung der Proliferation und Einleitung des apoptotischen Zelltods stehen, diskutiert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die beschriebene Wirkung der NSAR am Beispiel des nicht-selektiven Cox-1/Cox-2-Hemmers Flufenaminsäure an einer Neuroblastom-Zelllinie untersucht und bestätigt. So haben relativ unspezifische Versuche, wie MTT-Tests und Untersuchungen der Zellmorphologie, die hemmende Wirkung von Flufenaminsäure auf die Vitalität, Aktivität und Proliferation der Neuroblastomzellen der Zelllinie KELLY belegt. Spezifischere Untersuchungen, wie Apoptose-Tests mit Acridinorange und Ethidiumbromid (AO/EB-Färbung) und FACS-Analysen mit Propidiumjodid, haben gezeigt, dass die Neuroblastomzellen unter dem Einfluss von Flufenaminsäure bei entsprechender Konzentration die Apoptose einleiten. Die für die Proteomanalysen gewählte Konzentration von 500 μ M Flufenaminsäure, für die bei den beschriebenen Versuchen deutliche Effekte zu beobachten waren, lag dabei deutlich über der für die Cyclooxygenase-Hemmung notwendigen Konzentration, was auf der Annahme beruht, dass die pro-apoptotische Wirkung auch auf Cyclooxygenase-unabhängige Mechanismen, die erst auf höhere Konzentrationen ansprechen, zurückzuführen ist.

So wurden bei den Proteomanalysen der Neuroblastomzellen, die über 3 h, 6 h, 9 h und 12 h mit 500 μ M Flufenaminsäure behandelt wurden, zwölf Proteine differentiell zur Kontroll-Gruppe reguliert, für die ein Zusammenhang mit der Hemmung der Cyclooxygenasen bisher nicht bekannt ist, und von denen nur drei, nämlich Hsp75, Hsc70/54 und Lbp, direkt oder indirekt in Verbindung mit einem NSAR erwähnt werden. Die Gruppe dieser identifizierten Proteine kann man als recht heterogen bezeichnen. So sind die drei Proteine Hsp75, Hsc70/54 und TCP-1 ϵ als molekulare Chaperone bekannt, vier andere Proteine, Eno-1, PK-M1/M2, PDC-E2 und MDH1, sind direkt oder indirekt über die Glykolyse an der Energiegewinnung und -bereitstellung beteiligt. RbP0, eEF2 und sEF2b sind regulierende Enzyme der Translation, während p47 als Co-Faktor von p97 an Membranfusionen beteiligt ist und Lbp als Laminin-Rezeptor fungiert. Trotz der zum Teil sehr unterschiedlichen Funktionen wurden die meisten dieser durch Flufenaminsäure regulierten Proteine bereits in Verbindung mit Apoptose, Zell-Proliferation oder Krebs erwähnt. Ein Zusammenhang zwischen den beschriebenen Beobachtungen auf zellulärer Ebene, der bekannten pro-apoptotischen und anti-proliferativen Wirkung von NSAR und den identifizierten regulierten Proteinen auf molekularer Ebene ist naheliegend.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bieten also einerseits neue Ansatzpunkte für die weitere Erforschung der Mechanismen, durch die NSAR die Apoptose einleiten und die Proliferation

hemmen können. Andererseits könnten einige der regulierten Proteine pharmakologische Targets für die Behandlung von Krebserkrankungen darstellen.

Die ein- und zweidimensionalen Western-Blot-Analysen von Hsp75, Hsc70/54 und p47 haben beispielhaft deutlich gemacht, dass auf der Ebene der Proteine für ein Genprodukt häufig mehrere Isoformen und post-translational modifizierte Formen vorliegen, die im 2D-Protein-Muster als einzelne Protein-Spots erscheinen. Dabei zeigte sich besonders für Hsc70/54 und p47, dass die einzelnen Formen dieses Proteins unter dem Einfluss von Flufenaminsäure zum Teil ebenfalls differentiell zur Kontrolle reguliert wurden. Diese Beobachtungen deuten auf komplexe Regulationen hin, deren Aufklärung sicherlich noch eine Reihe von weiteren Versuchen erfordert.

Die Untersuchungen der mRNA-Expression der einzelnen identifizierten Proteine haben die mangelnde Korrelation zwischen mRNA- und Proteinexpression, die in verschiedenen Arbeiten bereits beschrieben wurde, bestätigt (Anderson L, Seilhamer J, 1997; Gygi S, et al., 1999; Tew KD, et al., 1996). Nur für Hsp75 wurde parallel zur Hochregulation des Proteins auch eine statistisch signifikant erhöhte Expression der mRNA beobachtet. Die mRNA-Expression der anderen regulierten Proteine veränderte sich entweder kaum, oder zu einem Zeitpunkt, der nach der Regulation des entsprechenden Proteins lag. In dem Fall von Lbp verlief die Regulation von Protein und mRNA sogar gegenläufig. Es ist also davon auszugehen, dass der Großteil der identifizierten Proteine unabhängig von der Transkription über die Translation, durch post-translationale Modifikationen oder durch proteolytische Prozessierungen bzw. Abbau reguliert wird.

Durch die Identifizierung dieser zwölf Proteine, die unter dem Einfluss von Flufenaminsäure parallel zu apoptotischen Prozessen in den Neuroblastomzellen reguliert wurden, sind im Rahmen dieser Arbeit sowohl neue Ansatzpunkte für die Erforschung der Wirkung von NSAR auf Apoptose und Tumorgenese, als auch mögliche Targets innovativer Therapieansätze für die Krebstherapie beschrieben worden.

6. Abkürzungsverzeichnis

(NH ₄) ₂ SO ₄	Diammoniumsulfat
13-S-HODE	Hydroxyoctadecadiensäure
15-LOX-1	15-Lipoxygenase-1
1D-SDS-PAGE	eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
2D-SDS-PAGE	zweidimensionale SDS-PAGE
AAA-ATPase	ATPases associated with different cellular activities
ADP	Adenosindiphosphat
Ag	Antigen
AgNO ₃	Silbernitrat
AIF	apoptosis-inducing factor
Ak	Antikörper
AMA	anti-mitochondriale IgG-Antikörper
AMID	AIF-homologous mitochondrion-associated inducer of death
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPs	apoptogenic mitochondrial proteins
AMV-RT	reverse Transkriptase aus dem <i>Avian myoblastosis virus</i>
AO	Acridinorange
Apaf-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
APC	adenomatous polyposis coli
APPROVe	Adenomatous Polyp Prevention On VIOXX-study
APS	Ammoniumpersulfat
ASCT	Autologous stem cell transplantation
ASS	Acetylsalicylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	Bcl-2-antagonist of cell death
BAG-1	Bcl-2-associated anthanogene-1
Bax	Bcl-2-associated protein x
Bcl-2	B-cell leukaemia/ lymphoma protein 2
bFGF	basic fibroblast growth factor
Bid	BH3-interacting domain death agonist
CAD	caspase activated DNase

CAM	cell adhesion molecule
cAMP	zyklisches AMP
CBET	Chemoprevention for Barrett's Esophagus Trial
CCT	Chaperonin-containing TCP-1
cDNA	copy-DNA
CHAPS	3-((3-cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propansulfonat
CHAPS	Cholamidopropionsäuresulfonat
CO ₂	Kohlendioxid
CoA	Coenzym A
Cox	Cyclooxygenase
CPL	zyklisches Polylactat (cyclic polylactate)
DD-PCR	differential-display-PCR
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DLCL	diffus großzelliges Lymphom
DM	„double minutes“ Chromosom
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DP ₁ , DP ₂	PGD ₂ -Rezeptor-Subtypen
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DSMZ	Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreitol
ε	Extinktionskoeffizient
E2F	Transkriptionsfaktor E2F
EB	Ethidiumbromid
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethyldiamintetraessigsäure
eEF2	Eukaryotischer Elongationsfaktor 2
Egr-1	early growth response factor 1
Eno-1	Enolase-1 (alpha)
Eno-2	Enolase-2 (gamma)

Eno-3	Enolase-3 (beta)
EP ₁ - EP ₄	PGE ₂ -Rezeptor-Subtypen
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERK	extracellular signal-regulated kinase
ESI	Elektrospray-Ionisation
ESTs	expressed sequence tags
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FADD	Fas-associated via death domain
FCS	Fetal calve serum
FP	PGF _{2α} -Rezeptor-Subtyp
FSC	Forward-Scatter
FTI	Farnesyltransferase-Inhibitor
GC	Gaschromatograph
G-CSF	Granulozyten-Kolonien-stimulierender Faktor
GTC	Guanidinisothiocyant
h	Stunde (hour)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HDAC	Histon-Deacetylase
HIF	hypoxia inducible factor
HIVS	β-Hydroxyisovalerylshikonin
HMGB1 & 2	High mobility group protein B1 & B2
HRE	hypoxia response element
HRPO	Horseradish Peroxidase
Hsc70/54	Heat shock cognate protein 54; Heat shock cognate protein, 71-kDa
HSF1	Heat shock factors 1
Hsp60	Heat shock protein 60
Hsp70	Heat shock protein 70
Hsp75	Heat shock protein 75
Hsp90	Heat shock protein 90
HSR	homogeneously-stained region
IEF	isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G

IgM	Immunglobulin M
IKK β	I κ B-Kinase
INSS	Interational neuroblastoma staging system
IP	PGI ₂ -Rezeptor-Subtyp
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
I κ B α	NF- κ B-Inhibitor
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
LAf	Laminar Air Flow
Lbp	Laminin-bindendes Protein
MALDI-TOF	Matrix-assisted Laser Desorption Ionisation – Time of Flight
MAPEG	membrane-associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDH1	Cytosolische Malat-Dehydrogenase
MEK	MAP/ERK-kinase
MIBG	meta-Jodbenzylguanidin
min	Minute
MMLV-RT	reverse Transkriptase aus dem <i>Moloney murine leukemia virus</i>
mPGES	Mikrosomale PGE-Synthase
mRNA	messenger-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	Massenspektrometer
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Moekulargewicht (molecular weight)
N ₂	Stickstoff
Na ₂ CO ₃	Dinatriumcarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinsäureamidadenindinukleotid

NADH	Reduziertes Nicotinsäureamidadenindinukleotid
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NaS ₂ O ₃	Natriumthiosulfat
NF-κB	nuclear factor-κB
NNE	nicht-neuronale Enolase
NO	Stickstoffmonoxid
NSAID	non-steroidal anti-inflammatory drug
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
NSE	Neuron-spezifische Enolase
OD	optische Dichte
p40	Vorläufer-Protein von 67 kDa Lbp
p47	p47, Co-Faktor von p97
PBC	primäre biliäre Zirrhose (primary biliary cirrhosis)
PBS	physiologischer Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PDC-E2	Dihydrolipoamid-Acetyltransferase, Pyruvat-Dehydrogenase-Komplex, Untereinheit E2
PDT	photodynamische Therapie
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandin F _{2α}
PGH ₂	Prostaglandin H ₂
PGI ₂	Prostazyklin
pI	isoelektrischer Punkt
PI	Propidiumjodid
PK-M1/M2	Pyruvat-Kinase, Isoform M1 oder M2
PMF	peptide-mass fingerprinting
PMT	Photomultiplier
PPA	Piperidinopropionamid
PS	Phosphatidylserin
PTM	post-translationale Modifikation
Raf	Ras-activated factor
Rb	Retinoblastom-Protein

RbP0	Ribosomales Protein P0
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
rRNA	ribosomale RNA
SAGE	Serial analysis of gene expression
SAPK	stress-activated protein kinase
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDS	Natriumdodecylsulfat
sEF2b	Similar to Elongation factor 2b
SLE	systemischer Lupus erythematos
SODD	Silencer Of Death Domain
SSC	Side-Scatter
ssDNA	Einzelstrang-DANN
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TCP-1 ϵ	T-Complex protein 1, Epsilon Untereinheit
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNFR-1	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor Typ 1
TOF	time-of-flight
TP	TXA ₂ -Rezeptor-Subtyp
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAP1	Tumor necrosis factor receptor-associated protein 1
tRNA	Transfer-RNA
Tx	Thromboxan
TXA ₂	Thromboxan A ₂
UBA-Domäne	Ubiquitin-assoziierte Domäne
VCP (= p97)	valosin-containing protein
VEGF	vascular endothelial growth factor
VHL	von-Hippel-Lindau-Tumorsuppressorprotein
WHO	World Health Organization
ZNS	zentrales Nervensystem

7. Literaturverzeichnis

- Abbott A, A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis, 1999, *Nature*, 402, 715-720
- Adams JM, Cory S, The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival, 1998, *Science*, 281, 1322-1326
- Ahn SG, Kim SA, Yoon JH, Vacratsis P, Heat shock cognate 70 is required for the activation of heat shock factor 1 in mammalian cells, 2005, *Biochem J*, 392, 145-152
- Ahn YS, Rempel A, Zerban H, Bannasch P, Over-expression of glucose transporter isoform GLUT1 and hexokinase I in rat renal oncocyctic tubules and oncocyctomas, 1994, *Virchows Arch*, 425, 63-68
- Aliño SF, Unda FJ, Perez-Yarza G, Cañavate ML, Are laminin binding sites on tumor cell surface involved in the indomethacin-induced sensitivity to natural cytotoxic cells?, 1989, *Biol Cell*, 66, 255-261
- Alshafie GA, Abou-Issa HM, Seibert K, Harris RE, Chemotherapeutic evaluation of Celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in a rat mammary tumor model, 2000, *Oncol Rep*, 7, 1377-1381
- Altenberg B, Greulich KO, Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes, 2004, *Genomics*, 84, 1014-1020
- Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR, Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes, 1977, *Proc Natl Acad Sci USA*, 74, 5350-5354
- An der Lan B, Chrambach A, Analytical and preparative gel electrofocusing, 1985, Hames BD, Rickwood D (eds), *Gel electrophoresis of proteins. A practical approach*, IRL Press, Oxford
- Anderson L, Seilhamer J, A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver, 1997, *Electrophoresis*, 18, 533-537
- Anderson NL, Anderson NG, Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words, 1998, *Electrophoresis*, 19, 1853-1861
- Arai T, Ogawa T, Nakamura M, Hosoya M, Ohnishi Y, Changes in hepatic enzyme activities in transgenic mice carrying human prototype c-Ha-ras gene treated with diethylnitrosamine, 2002, *J Vet Med Sci*, 64, 1065-1067
- Arispe N, De Maio A, ATP and ADP modulate a cation channel formed by Hsc70 in acidic phospholipid membranes, 2000, *J Biol Chem*, 275, 30939-30843
- Arispe N, Doh M, Simakova O, Kurganov B, De Maio A, Hsc70 and Hsp70 interact with phosphatidylserine on the surface of PC12 cells resulting in a decrease of viability, 2004, *FASEB J*, 18, 1636-1645
- Ashkenazi A, Dixit VM, Death receptors: signaling and modulation, 1998, *Science*, 281, 1305-1308

- Auth D, Brawerman G, A 33kDa polypeptide with homology to the laminin receptor; component of translation machinery, 1992, *Proc Natl Acad Sci USA*, 89, 4368-4372
- Baldo BA, Torey ER, Ford SA, Comparison of different blocking agents and nitrocelluloses in the solid phase detection of proteins by labelled antisera and protein A, 1986, *J Biochem Biophys Meth*, 12, 171-179
- Baldwin AS, The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights, 1996, *Annu Rev Immunol*, 14, 649-681
- Balinsky D, Platz CE, Lewis JW, Enzyme activities in normal, dysplastic, and cancerous human breast tissues, 1984, *J Natl Cancer Inst*, 72, 217-224
- Barker PE, Double minutes in human tumor cells, 1982, *Cancer Genet Cytogenet*, 5, 81-49
- Barkett M, Gilmore TD, Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors, 1999, *Oncogene*, 18, 6910-6924
- Barnes CJ, Lee M, Determination of an optimal dosing regimen for aspirin chemoprevention of 1,2-dimethylhydrazine-induced colon tumours in rats, 1999, *Br J Cancer*, 79, 1646-1650
- Baron JA, Cole BF, Sandler RS, Haile RW, Ahnen D, Bresalier R, McKeown-Eyssen G, Summers RW, Rothstein R, Burke CA, Snover DC, Church TR, Allen JI, Beach M, Beck GJ, Bond JH, Byers T, Greenberg ER, Mandel JS, Marcon N, Mott LA, Pearson L, Saibil F, van Stolk RU, A randomised trial of aspirin to prevent colorectal adenomas, *N Engl J Med*, 348, 891-899
- Bays NW, Wilhovsky SK, Goradia A, Hodgkiss-Harlow K, Hampton RY, HRD/NPL4 is required for the proteasomal processing of ubiquitinated ER proteins, 2001, *Mol Biol Cell*, 12, 4114-4128
- Beck K, Hunter I, Engel J, Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein, 1990, *FASEB J*, 4, 148-160
- Benamouzig R, Deyra J, Martin A, Girard B, Jullian E, Piednoir B, Couturier D, Coste T, Little J, Chaussade S, Daily soluble aspirin and prevention of colorrectal adenoma recurrence : one-year results of the APACC trial, 2003, *Gastroenterology*, 125, 612-614
- Bennett A, Del Tacca M, Proceedings: Prostaglandins in human colonic carcinoma, 1975, *Gut*, 16, 409
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, In *Biochemie*, 5. Auflg., Kap. 16: Glykolyse und Gluconeogenese, 2003, Spektrum Akademischer Verlag
- Bergman AC, Alaiya AA, Wendler W, Binetruy B, Shoshan M, Sakaguchi K, Bergman T, Kronenwett U, Auer G, Appella E, Jornvall H, Linder S, Protein kinase-dependent overexpression of the nuclear protein pirin in c-JUN and RAS transformed fibroblasts, 1999, *Cell Mol Life Sci*, 55, 467-471
- Bers G, Garfin D, Protein and nucleic acid blotting and immunobiochemical detection, 1985, *BioTechniques*, 3, 276-288
- Bertagnolli MM, The potential of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) for colorectal cancer prevention, 2003, *J Surg Oncol*, 84, 113-119

- Berthold F (Principal investigator) Dept. Pediatric Oncology and Hematology, Children's Hospital, University of Cologne, NB2004 Trial Protocol for Risk Adapted Treatment of Children with Neuroblastoma, 01.09.2004, Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
- Bittner M, Kupferer P, Morris CF, Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids to diazobenzoyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets, 1980, *Anal Biochem*, 102, 459-471
- Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Görg A, Westermeier R, Postel W, Isoelectric focusing in immobilised pH gradients: principle, methodology and some applications, 1982, *J Biochem Biophys Methods*, 6, 317-339
- Bjellqvist B, Sanchez JC, Pasquali C, Ravier F, Paquet N, Frutiger S, Hughes GJ, Hochstrasser DF, Micropreparative two-dimensional electrophoresis allowing the separation of samples containing milligram amounts of proteins, 1993, *Electrophoresis*, 14, 1375-1378
- Blackstock, Weir, Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins, 1999, *Trends Biotechnol*, 17, 121-127
- Blatteiger B, Newhall WJV, Johnes RB, The use of Tween 20 as blocking agent in the immunological detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes, 1982, *J Immunol Methods*, 55, 297-307
- Blum H, Beier H, Gross HJ, Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels, 1987, *Electrophoresis*, 8, 93-99
- Boldin MP, Mett IL, Varfolomeev EE, Chumakov I, Shemer-Avni Y, Camonis JH, Wallach D, Self-association of the "death domains" of the p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor and Fas(APO1 prompts signalling for TNF and Fas/APO1 effects, 1995, *J Biol Chem*, 270, 387-391
- Bonner WA, Hulett HR, Sweet RG, Herzenberg LA, Fluorescence activated cell sorting, 1972, *Rev Sci Instrum*, 43, 404-409
- Botha JH, Robinson KM, Ramchurren N, Reddi K, Norman RJ, Human esophageal carcinoma cell lines: prostaglandin production, biological properties, and behaviour in nude mice, 1986, *J Natl Cancer Inst*, 76, 1053-1056
- Bradford MM, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, 1976, *Anal Biochem*, 72, 248-254
- Braun S, Matuschewski K, Rape M, Thomas S, Jentsch S, Role of the ubiquitin-selective CDC48/UFD1/NPL4 chaperon (segregase) in ERAD of OLE1 and other substrates, 2002, *EMBO J*, 21, 615-621
- Breuer-Katschinski B, Nemes K, Rump B, Leiendecker B, Marr A, Breuer N, et al., Long-term use of nonsteroidal antiinflammatory drugs and the risk of colorectal adenomas. The Colorectal Adenoma Study Group, 2000, *Digestion*, 61, 129-134
- Brockstedt E, Rickers A, Kostka S, Laubersheimer A, Dörken B, Wittmann-Liebold B, Bommert K, Otto A, Identification of apoptosis-associated proteins in a Burkitt lymphoma cell line, 1998, *J Biol Chem*, 273, 28057-28064
- Brodeur GM, Azar C, Brother M, Hiemstra J, Kaufman B, Marshall H, Moley J, Nakagawara A, Saylor R, Scavarda N, et al., Neuroblastoma. Effect of genetic factors on prognosis and treatment, 1992, *Cancer*, 70, 1685-1694

- Brodeur GM, Hayes FA, Green AA, Casper JT, Wasson J, Wallach S, Seeger RC, Consistent N-myc copy number in simultaneous or consecutive neuroblastoma samples from sixty individual patients, 1987, 47, 4248-4253
- Brodeur GM, Molecular pathology of human neuroblastomas, 1994, Semin Diagn Pathol, 11, 118-125
- Brodeur GM, Prichard J, Berthold F, et al., Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment, 1993, J Clin Oncol, 11, 1466-1477
- Brodeur GM, Seeger RC, Barrett A, et al., International criteria for diagnosis, staging, and response to treatment in patients with neuroblastoma, 1988, J Clin Oncol, 6, 1874-1881
- Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus, HE, Bishop JM, Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage, 1984, Science, 224, 1121-1124
- Browne GJ, Proud CG, Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells, 2002, Eur J Biochem, 269, 5360-5368
- Bryan M, Drew GM, Houston P, Hissey P, Campbell CJ, Braddock M, Tissue repair with a therapeutic transcription factor, 2000, Hum Gene Ther, 11, 2143-2158
- Burnette WH, Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from SDS-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A, 1981, Anal Biochem, 112, 195-203
- Buto S, Tagliabue E, Ardini E, et al., Formation of the 67-kDa laminin receptor by acylation of the precursor, 1998, J Cell Biochem, 69, 244-251
- Caldwell SH, et al., Autoantibodies in kindreds of patients with primary biliary cirrhosis: antimitochondrial antibodies are unique to clinical disease and are absent in asymptomatic family members, 1992, Hepatology, 16, 899-905
- Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB, Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing, 1987, Cancer Res, 47, 936-942
- Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A, Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface blebs on cultured keratinocytes, 1994, J Exp Med, 179, 1317-1330
- Castronovo V, Laminin receptors and laminin-binding proteins during tumor invasion and metastasis, 1993, Invasion Metastasis, 13, 1-30
- Chai J, Du C, Wu JW, Kyin S, Wang X, Shi Y, Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO, 2000, Nature, 406, 855-862
- Chan TA, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW, Mechanisms underlying nonsteroidal antiinflammatory drug-mediated apoptosis, 1998, Proc Natl Acad Sci USA, 95, 681-686
- Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KLT, et al., COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression, 2002, Proc Natl Acad Sci USA, 99, 13926-13931

- Chapal N, Molina L, Molina F, Laplanche M, Pau B, Petit P, Pharmacoproteomic approach to the study of drug mode of action, toxicity, and resistance: applications in diabetes and cancer, 2004, *Fundam Clin Pharmacol*, 18, 413-422
- Chau BN, Borges HL, Chen TT, Masselli A, Hunton IC, Wang JYJ, Signal-dependent protection from apoptosis in mice expressing caspase-resistant Rb, 2002, *Nature Cell Biol*, 4, 757-765
- Chau BN, Wang JYJ, Coordinated regulation of life and death by Rb, 2003, *Nature rev*, 3, 130-138
- Chen CF, Chen Y, Dai K, Chen PL, Riley DJ, Lee WH, A new member of the hsp90 family of molecular chaperones interacts with the retinoblastoma protein during mitosis and after heat shock, 1996, *Molec Cell Biol*, 16, 4691-4699
- Cheng NC, Van Roy N, Chan A, Beitsma M, Westerveld A, Speleman F, Versteeg R, Deletion mapping in neuroblastoma cell lines suggests two distinct tumor suppressor genes in the 1p35-36 region, only one of which is associated with N-myc amplification, 1995, *Oncogene*, 10, 291-297
- Cheng T, Cao W, Wen R, Steinberg RH, LaVail MM, Prostaglandin E₂ induces vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor mRNA expression in cultured rat Muller cells, 1998, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 39, 581-591
- Chirgwin JJ, Przybyla AE, MacDonald RJ, Rutter WJ, Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease, 1979, *Biochemistry*, 18, 5294-5299
- Chomczynski P, Sacchi N, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, 1987, *Anal Biochem*, 162, 156-159
- Cohn SL, Salwen H, Quasney MW, Ikegaki N, Cowan JM, Herst CV, Kennett RH, Rosen ST, DiGiuseppe JA, Brodeur GM, Prolonged N-myc protein half-life in a neuroblastoma cell line lacking N-myc amplification, 1990, *5*, 1821-1827
- Colas des Francs C, Thiellement H, De Vienne D, Analysis of leaf proteins by two-dimensional electrophoresis, 1985, *Plant Physiol*, 78, 178-182
- Coleman RA, Smith WL, Narumya S, IUP classification of prostanoid receptors: Properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes, 1994, *Pharm Rev*, 46, 205-229
- Coller HA, Grandori C, Tamayo P, Colbert T, Lander ES, Eisenman RN, Golub TR, Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveal that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion, 1999, *Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 3260-3265
- Compton SJ, Jones CG, Mechanisms of dye response and interference in the Bradford protein assay, 1985, *Anal Biochem*, 151, 369-374
- Constantine NT, Bansal J, Zhang X, Hyams KC, Hayes C, Enhanced chemiluminescence as a means of increasing the sensitivity of Western blot assays for HIV antibody, 1994, *J Virol Methods*, 47, 153-164
- Coogan PF, Rosenberg L, Louik C, Zauberg AG, Stolley PD, Strom BL, et al., NSAIDs and risk of colorectal cancer according to presence or absence of family history of the disease, 2000, *Cancer Causes Control*, 11, 249-255

- Corbett J, Dunn MJ, Posch A, Görg A, Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional gel electrophoresis using immobilised pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: an interlaboratory comparison, 1994, *Electrophoresis*, 15, 1205-1211
- Cowell JK, Double minutes and homogenously staining regions: gene amplification in mammalian cells, 1982, 16, 21-59
- Cramer DW, Harlow B, Titus-Ernstoff L, Bohlke K, Welch WR, Greenberg ER, Over-the-counter analgesics and risk of ovarian cancer, 1998, *Lancet*, 351, 104-107
- Craven PA, DeRubertis FR, Effects of aspirin on 1,2-dimethylhydrazine-induced colonic cancerogenesis, 1992, *Cancerogenesis*, 13, 541-546
- Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F, Features of apoptotic cells measured by flow cytometry, 1992, *Cytometry*, 13, 795-808
- Davis AE, Patterson F, Aspirin reduces the incidence of colonic carcinoma in the dimethylhydrazine art animal model, 1994, *Aust N Z J Med*, 24, 301-303
- de la Rosa EJ, Vega-Núñez E, Morales AV, Serna J, Rubio E, Modulation of the chaperone heat shock cognate 70 by embryonic (pro)insulin correlates with prevention of apoptosis, 1998, *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 9950-9955
- Distelhorst CW, Recent insights into the mechanism of glucocorticoid-induced apoptosis, 2002, *Cell Death Differ*, 9, 6-19
- Dittmar G, Schmidt G, Kopun M, Werner D, Mapping of G2/M-phase prevalences of chaperon-encoding transcripts by means of a sensitive differential hybridization approach, 1997, *Cell Biol Int*, 21, 383-391
- Dombrackas JD, Santarsiero BD, Mesecar AD, Structural basis for tumor pyruvate kinase M2 allosteric regulation and catalysis, 2005, *Biochemistry*, 44, 9417-9429
- Dormond O, Foletti A, Paroz C, Rüegg C, NSAIDs inhibit $\alpha V\beta 3$ integrin-mediated and Cdc42/Rac-dependent endothelial-cell spreading, migration and angiogenesis, 2001, *Nat Med*, 7, 1041-1047
- Dunaief JL, et al., The retinoblastoma protein and BRG1 form a complex and cooperate to induce cell cycle arrest, 1994, *Cell*, 79, 119-130
- Duperron C, Castonguay A, Chemopreventive efficacies of aspirin and sulindac against lung tumorigenesis in A/J mice, 1997, *Carcinogenesis*, 18, 1001-1006
- Durany N, Joseph J, Jimenez OM, Climent F, Fernández PL, Rivera F, Carreras J, Phosphoglycerate mutase, 2,3-bisphosphoglycerate phosphatase, creatine kinase and enolase activity and isoenzymes in breast carcinoma, 2000, *Br J Cancer*, 82, 20-27
- Durrant I, Light-based detection of biomolecules, 1990, *Nature*, 346, 297-298
- Dworniczak B, Mirault ME, Structure and expression of a human gene coding for a 71 kd heat shock 'cognate' protein, 1987, *Nucleic Acids Res*, 15, 5181-5197
- Egan KM, Stampfer MJ, Giovannucci E, Rosner BA, Colditz GA, Prospective study of regular aspirin use and the risk of breast cancer, 1996, *J Natl Cancer Inst*, 88, 988-993
- Elstein KH, Thomas DJ, Zucker RM, Factors affecting flow cytometric detection of apoptotic nuclei by DNA analysis, 1995, *Cytometry*, 21, 170-176

- Elstein KH, Zucker RM, Comparison of cellular and nuclear flow cytometric techniques for discriminating apoptotic subpopulations, 1994, *Exp Cell Res*, 211, 322-331
- Ergun S, Kilic N, Wurmbach JH, Ebrahimnejad A, Fernando M, Sevinc S, Kilic E, Chalajour F, Fiedler W, Lauke H, Lamszus K, Hammerer P, Weil J, Herbst H, Folkman J, Endostatin inhibits angiogenesis by stabilization of newly formed endothelial tubes, 2001, *Angiogenesis*, 4, 193-206
- Eschenbruch M, Bürk RR, Experimentally improved reliability of ultrasensitive silver staining of protein in polyacrylamide gels, 1982, *Anal Biochem*, 125, 96-99
- Evans AE, D'Angio GJ, Randolph J, A proposed staging for children with neuroblastoma, 1971, *Cancer*, 27, 374-378
- Farber S, Toch R, Chemotherapy of disseminated neuroblastoma in children, 1951, *Am J Dis Child*, 2, 329
- Feldkamp MM, Lau N, Roncari L, Guha A, Iso-type-specific Ras.GTP-levels predict the efficacy of farnesyl transferase inhibitors against human astrocytomas regardless of Ras mutational status, 2001, *Cancer Res*, 61, 4425-4431
- Felts SJ, Owen BAL, Nguyen P, Trepel J, Donner DB, Toft, DO, The hsp90- related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties, 2000, *J Biol Chem*, 275, 3305-3312
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM, Electrospray ionisation for mass spectrometry of large biomolecules, 1989, *Science*, 246, 64-71
- Feo S, Arcuri D, Piddini E, Passantino R, Giallongo A, ENO1 gene product binds to the c-myc promoter and acts as a transcriptional repressor: relationship with Myc promoter-binding protein 1 (MBP-1), 2000, *FEBS Letters*, 473, 47-52
- Ferri KF, Kroemer G, Organelle-specific initiation of cell death pathways, 2001, *Nat Cell Biol*, 3, E255-E263
- Fields C, Analysis of gene expression by tissue and developmental stage, 1994, *Curr Opin Biotechnol*, 5, 595-598
- Figeys D, Ducret A, Yates JR 3rd, Aebersold R, Protein identification by solid phase microextraction-capillary zone electrophoresis-microelectrospray-tandem mass spectrometry, 1996, *Nature Biotechnology*, 14, 1579-1583
- Fischer SM, Lo HH, Gordon GB, Seibert K, Kelloff G, Lubet RA, et al., Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, and indomethacin against ultraviolet light-induced skin carcinogenesis, 1999, *Mol Carcinog*, 25, 231-240
- Flemington EK, Speck SH, Kaelin WJ, E2F-1-mediated transactivation is inhibited by complex formation with the retinoblastoma susceptibility gene product, 1993, *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 6914-6918
- Fletcher L, Rider CC, Taylor CB, Adamson ED, Luke BM, Graham CF, Enolase isoenzymes as markers of differentiation in teratocarcinoma cells and normal tissues of mouse, 1978, *Dev Biol*, 65, 462- 475

- Forsythe JA, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL, Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension, 1995, *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 5510-5514
- Fox CK, Furtwaengler A, Nepomuceno RR, et al., Apoptotic pathways in primary biliary cirrhosis and autoimmune hepatitis, 2001, *Liver*, 21, 272-279
- Frampton G, Moriya S, Pearson JD, Isenberg DA, Ward FJ, Smith TA, Panayiotou A, Staines NA, Murphy JJ, Identification of candidate endothelial cell autoantigens in systemic lupus erythematosus using a molecular cloning strategy: a role for ribosomal P protein P0 as an endothelial cell autoantigen, 2000, *Rheumatology*, 39, 1114-1120
- Freeman BC, Myers MP, Schumacher R, Morimoto RI, Identification of a regulatory motif in Hsp70 that effects ATPase activity, substrate binding and interaction with HDJ-1, 1995, *EMBO J*, 14, 2281-2292
- Funk CD, Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology, 2001, *Science*, 294, 1871-1875
- Gabai VI, Meriin AB, Mosser DD, Caron AW, Rits S, Shifrin VI, Sherman MY, Hsp70 prevents activation of stress kinases. A novel pathway of cellular thermotolerance, 1997, *J Biol Chem*, 272, 18033-18037
- Gallo O, Franchi A, Magnelli L, Sardi I, Cannicci A, Boddi V, Chiarugi V, Masini E, Cyclooxygenase-2 Pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for tumor angiogenesis and metastasis, 2001, *Neoplasia*, 3, 53-61
- Gao Y, Thomas JO, Chow RL, Lee GH, Cowan NJ, A cytoplasmatic chaperonin that catalyses beta-actin folding, 1992, *Cell*, 69, 1043-1050
- Garcia-Rodriguez LA, Huerta-Alvarez C, Reduced risk of colorectal cancer among long-term users of aspirin and nonaspirin nonsteroidal antiinflammatory drugs, 2001, *Epidemiology*, 12, 88-93
- Gerber HJP, Condorelli F, Park J, Ferrara N, Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia, 1997, *J Biol Chem*, 272, 23659-23667
- Gerbitz KD, Summer J, Schumacher I, Enolase isoenzymes as tumour markers, 1986, *J Clin Chem Clin Biochem*, 24, 1009-1016
- Gerli R, Caponi L, Anti-ribosomal P protein antibodies, 2005, *Autoimmunity*, 38, 85-92
- Gershwin ME, Mackay IR, Sturgess A, Coppel RL, Identification and specificity of a cDNA encoding the 70 kd mitochondrial antigen recognized in primary biliary cirrhosis, 1987, *J Immunol*, 138, 3525-3531
- Giovannucci E, Egan KM, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Aspirin and the risk of colorectal cancer in women, 1995, *N Engl J Med*, 333, 609-614
- Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer M, Colditz G, Asherio A, Willett W, Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals, 1994, *Ann Intern Med*, 121, 241-246

Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG, Life with 6000 genes, 1996, *Science*, 274, 546, 563-567

Gordon JA, Jencks WP, The relationship of structure to the effectiveness of denaturing agents for proteins, 1963, *Biochemistry*, 2, 47-57

Görg A, Boguth G, Obermaier C, Posch A, Weiss W, Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems, 1995, *Electrophoresis*, 16, 1079-1086

Görg A, Obermeier C, Boguth G, Weiss W, Recent developments in IPG-Dalt: Wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures, 1999, *Electrophoresis*, 20, 712-717

Görg A, Postel W, Friedrich C, Kuick R, Strahler JR, Hanash SM, Temperature-dependent spot positional variability in two-dimensional polypeptide patterns, 1991, *Electrophoresis*, 12, 653-658

Görg A, Postel W, Günther S, The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients, 1988, *Electrophoresis*, 9, 531-546

Görg A, Postel W, Weser J, Günther S, Strahler SR, Hanash SM, Somerlot L, Elimination of point streaking on silver stained two-dimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration buffer, 1987, *Electrophoresis*, 8, 122-124

Gower HJ, Barton CH, Elsom VL, Thompson J, Moore SE, Dickson G, Walsh FS, Alternative splicing generates a secreted form of N-CAM in muscle and brain, 1988, *Cell*, 55, 955-964

Grabowski DT, Deutsch WA, Derda D, Kelley MR, Drosophila AP3, a presumptive DNA repair protein, is homologous to human ribosomal associated protein P0, 1991, *Nucleic Acids Res*, 19, 4297

Grabowski DT, Pieper RO, Futscher BW, Deutsch WA, Erickson LC, Kelley MR, Expression of ribosomal phosphoprotein PO is induced by antitumor agents and increased in Mer- human tumor cell lines, 1992, *Carcinogenesis*, 13, 259-263

Graham AM, Dollinger MM, Howie SE, et al., Bile duct cells in primary biliary cirrhosis are 'primed' for apoptosis, 1998, *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 10, 540-541

Greenberg ER, Beron JA, Freeman DH Jr., Mandel JS, Haile R, Reduced risk of large-bowel adenomas among aspirin users. The Polyp Prevention Study Group, 1993, *J Natl Cancer Inst*, 85, 912-916

Gridley G, McLaughlin JK, Ekbom A, Klareskog L, Adami HO, Hacker DG, et al., Incidence of cancer among patients with rheumatoid arthritis, 1993, *J Natl Cancer Inst*, 85, 307-311

Grubbs CJ, Lubet RA, Koki AT, Leahy KM, Masferrer JL, Steele VE, et al., Celecoxib inhibits *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine-induced urinary bladder cancers in male B6D2F1 mice and Fischer-344 rats, 2000, *Cancer Res*, 60, 5599-5602

Gygi S, Rochon Y, Franz B, Aebersold R, Correlation between protein and mRNA abundance in yeast, 1999, *Mol Cell Biol*, 19, 1720-1730

- Hagel P, Gerding JJT, Fiegggen W, Bloemendal H, Cyanate formation in solutions of urea. I. Calculation of cyanate concentrations at different temperature and pH, 1971, *Biochim. Biophys. Acta*, 243, 366-373
- Haimoto J, Takahashi Y, Koshikawa T, Nagura H, Kato K, Immunohistochemical localization of γ -enolase in normal human tissues other than nervous and neuroendocrine tissues, 1985, *Lab Invest*, 52, 257-263
- Hanash SM, Strahler JR, Neel JV, Hailat N, Melham R, Keim D, Zhu XX, Wagner D, Gage DA, Watson JT, Highly resolving two-dimensional gels for protein sequencing, 1991, *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 5709-5713
- Harbour JW, Dean DC, Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis, 2000, *Nature Cell Biol*, 2, E65-E67
- Hardt PD, Ngoumou BK, Rupp J, Schnell-Kretschmer H, Kloer HU, Tumor M2-pyruvate kinase: a promising tumor marker in diagnosis of gastro-intestinal cancer, 2000, *Anticancer Res*, 20, 4965-4968
- Harris RE, Kasbari S, Farrar WB, Prospective study of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and breast cancer, 1999, *Oncol Rep*, 6, 71-73
- Hawkes R, Niday E, Gordon J, A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies, 1982, *Anal Biochem*, 119, 142
- Hayes FA, Green A, Hustu O, et al., Surgicopathologic staging of neuroblastoma prognostic significance of regional lymph node metastases, 1983, *J Pediatr*, 102, 59-62
- He DM, Lee SE, Hedrickson EA, Restoration of X-ray and etoposide resistance, Ku-end binding activity and V(D)J recombination to the Chinese hamster sxi-3 mutant by hamster Ku86 cDNA, 1996, *Mutat Res*, 363, 43-46
- He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, et al., Identification of c-MYC as a target of the APC pathway, 1998, *Science*, 281, 1509-1512
- Heath EI, Canto MI, Wu TT, Piantadosi S, Hawk E, Unalp A, Gordon G, Forastiere AA, CBET Research Group, Chemoprevention for Barrett's esophagus trial. Design and outcome measures, 2003, *Dis Esophagus*, 16, 177-186
- Heath EI, DeWeese TL, Partin AW, De Marzo AM, Groopman JD, Nelson WG, Piantadosi SA, Lieberman R, Carducci MA, The design of a randomised, placebo-controlled trial of celecoxib in preprostatectomy men with clinically localized adenocarcinoma of the prostate, 2002, *Clin Prostate Cancer*, 1, 182-187
- Heegard NHH, Bjerrum OJ, Immunoblotting – General principles and procedures. In: Bjerrum OJ, Heegard NHH (eds) *CRC handbook of immunoblotting of proteins*, 1989, CRC, Boca Raton, Florida, Vol I, 1-25
- Helin K, Harlow E, Fattaey A, Inhibition of E2F-1 transactivation by direct binding of the retinoblastoma protein, 1993, *Mol Cell Biol*, 13, 6501-6508
- Hengartner MO, The biochemistry of apoptosis, 2000, *Nature*, 407, 770-776
- Henriksson M, Luscher B, Proteins of the Myc network: essential regulators of cell growth and differentiation, 1996, *Adv Cancer Res*, 68, 109-182

- Henzel WJ, Billeci TM, Stults JT, Wong SC, Grimley C, Watanabe C, Identifying proteins from two-dimensional gels by molecular mass searching of peptide fragments in protein sequence databases, 1993, *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 5011-5015
- Herskovits TT, Jaillet H, Gadegbeku B, On the structural stability and solvent denaturation of proteins. II. Denaturation by the ureas, 1970, *J Biol Chem*, 245, 4544-4550
- Hetzer M, Meyer HH, Walther TC, Bilbao-Cortes D, Warren G, Mattaj IW, Distinct AAA-ATPase p97 complexes function in discrete steps of nuclear assembly, 2001, *Nat Cell Biol*, 3, 1086-1091
- Hitchcock AL, Krebber H, Fietze S, Lin A, Latterich M, Silver PA, The conserved Npl4 protein complex mediates proteasome-dependent membrane-bound transcription factor activation, 2001, *Mol Biol Cell*, 12, 3226-3241
- Hochstrasser DF, Harrington MG, Hochstrasser AC, Miller MJ, Merrill CR, Methods of increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis, 1988, *Anal Biochem*, 173, 424-435
- Hodgson M, Jones P, Enhanced chemiluminescence in the peroxidase-luminol-H₂O₂ system: Anomalous reactivity of enhancer phenols with enzyme intermediates, 1989, *J Biolumin Chemilumin*, 3, 21-25
- Höhfeld J, Jentsch S, GrpE-like regulation of the Hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1, 1997, *EMBO J*, 16, 6209-6216
- Höhfeld J, Regulation of heat shock cognate Hsc70 in the mammalian cell: the characterization of the anti-apoptotic protein BAG-1 provides novel insights, 1998, *Biol Chem*, 379, 269-274
- Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ, Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF, 1999, *Science*, 284, 1994-1998
- Horst MN, Basha MM, Baumbach GA, Mansfield EH, Roberts RM, Alkaline urea solubilization, two-dimensional electrophoresis and lectin staining of mammalian cell plasma membrane and plant seed proteins, 1980, *Anal Biochem*, 102, 399-408
- Hsu AL, Ching TT, Wang DS, Song X, Rangnekar VM, Chen CS, The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2, 2000, *J Biol Chem*, 275, 11397-11403
- Hu SM, Wang C, Involvement of the 10-kDa C-terminal fragment of hsc70 in complexing with unfolded protein, 1996, *Arch Biochem Biophys*, 332, 163-169
- Huang Y, He Q, Hillman MJ, Rong R, Sheikh Ms, Sulindac sulfide-induced apoptosis involves death receptor 5 and the caspase 8-dependent pathway in human colon and prostate cancer cells, 2001, *Cancer Res*, 61, 6918-6924
- Humphery-Smith I, Blackstock W, Proteome analysis: genomics via the output rather than the input code, 1997, *J Prot Chem*, 16, 537-544
- Husain SS, Szabo IL, Pai R, Soreghan B, Jones MK, Tarnawski AS, MAPK (ERK2) kinase – a key target for MSAIDs-induced inhibition of gastric cancer cell proliferation and growth, 2001, *Life Sciences*, 69, 3045-3054

- Ishiguro Y, Kato K, Ito T, Horisawa M, Nagaya M, Enolase isoenzymes as markers for differential diagnosis of neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, and Wilms'tumor, 1984, *Gann*, 75, 53-60
- Islam R, Ko C, Landers T, A new approach to rapid immobilised pH gradient IEF for 2-D electrophoresis, 1998, *Sci Tools*, 3, 14-15
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitination complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation, 2001, *Science*, 292, 468-472
- Jaffe BM, Prostaglandins and cancer: an update, 1974, *Prostaglandins*, 6, 453-461
- Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R, et al., Identification of human prostaglandin E synthase: A microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target, 1999, *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 7220-7225
- James P, Of genomes and proteomes, 1997, *Biochem Biophys Res Comm*, 231,1-6
- James P, Quadroni M, Carafoli E, Gonnet G, Protein identification by mass profile fingerprinting, 1993, *Biochem Biophys Res Commun*, 195, 58-64
- Janke C, Holzer M, Klose J, Arendt T, Distribution of isoforms of the microtubule-associated protein tau in grey and white matter areas of human brain: a two-dimensional gelelectrophoretic analysis, 1996, *FEBS Lett*, 379, 222-226
- Jiang Y, Woronicz JD, Liu W, Goeddel DV, Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains, 1999, *Science*, 283, 543-546
- Johnsen JI, Lindskog M, Ponthan F, Pettersen I, Elfman L, Orrego A, Sveinbjörnsson B, Kogner P, Cyclooxygenase-2 is expressed in neuroblastoma, and nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis and inhibit tumor growth *in vivo*, 2004, *Cancer Res*, 64, 7210-7215
- Johnson DA, Gautsch JW, Sportsman JR, Elder JH, Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acids transferred to nitrocellulose, 1984, *Gene Anal Tech*, 1, 3-8
- Johnsson A, Zeelenberg I, Min Y, Hilinski J, Berry C, Howell SB, Los G, Identification of genes differentially expressed in association with acquired cisplatin resistance, 2000, *Br J Cancer*, 83, 1047-1054
- Johnston NL, Cervenak J, Shore AD, Torrey EF, Yolken RH, Multivariate analysis of RNA levels from postmortem human brains as measured by three different methods of RT-PCR. Stanley Neuropathology Consortium, 1997, *J Neurosci Methods*, 77, 83-92
- Jones MK, Szabo IL, Kawanaka H, Husain SS, Tarnawski, AS, Von Hippel Lindau tumor suppressor and HIF-1 α – new targets of NSAIDs inhibition of hypoxia-induced angiogenesis, 2002, *FASEB J*, 16, 265-266
- Jones MK, Wang H, Peskar BM, Levin E, Itani RM, Sarfeh IJ, Tarnawski AS, Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing, 1999, *Nat Med*, 5, 1418-1423

- Joplin R, Gordon L, Lindsay J, et al., Membrane dihydrolipoamide acetyltransferase (E2) on human biliary epithelial cells in primary biliary cirrhosis, 1992, *Lancet*, 339, 93-94
- Jurivich DA, Sistonen L, Kroes RA, Morimoto RI, Effect of sodium salicylate on the human heat shock response, 1992, *Science*, 255, 1243-1245
- Kano F, Kondo H, Yamamoto A, Tanaka AR, Hosokawa N, Nagata K, Murata M, The maintenance of the endoplasmic reticulum network is regulated by p47, a cofactor of p97, through phosphorylation by cdc2 kinase, 2005, *Genes to Cells*, 10, 333-344
- Kaplan MM, Primary biliary cirrhosis, 1996, *N Engl J Med*, 335, 1570-1580
- Karas M, Hillenkamp F, Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10 000 daltons, 1988, *Anal Chem*, 60, 2299-2301
- Kato K, Ishiguro Y, Ariyoshi Y, Enolase isoencymes as disease markers :distribution of three enolase subunits (α , β and γ) in various human tissues, 1983, *Disease Markers*, 1, 213-220
- Kauppi M, Pukkala E, Isomaki H, Low incidence of colorectal cancer in patients with rheumatoid arthritis, 1996, *Clin Exp Rheumatol*, 14, 551-553
- Kawamori T, Rao CV, Seibert K, Reddy BS, Chemopreventive activity of celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 inhibitor, against colon carcinogenesis, 1998, *Cancer Res*, 58, 409-412
- Khuder SA, Mutgi AB, Breast cancer and NSAID use: a meta-analysis, 2001, *Br J Cancer*, 84, 1188-1192
- Kim JW, Dang CV, Multifaceted roles of glycolytic enzymes, 2005, *Trends Biochem Sci*, 30, 142-150
- Kim SH, Kim D, Han JS, Jeong CS, Chung BS, Kang CD, Li GC, Ku autoantigen affects the susceptibility to anticancer drugs, 1999, *Cancer Res*, 59, 4012-4017
- Kim SH, Kim D, Jung GS, Um JH, Chung BS, Kang CD, Involvement of c-Jun NH₂-terminal kinase pathway in differential regulation of heat shock proteins by anticancer drugs, 1999, *Biochem Biophys Res Commun*, 262, 516-522
- Kim WH, Yeo M, Kim MS, Chun SB, Shin EC, Park JH, Park IS, Role of caspase-3 in apoptosis of colon cancer cells induced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs, 2000, *Int J Colorectal Dis*, 15, 105-111
- Kishimoto Y, Takata N, Jinnai T, Morisawa T, Shiota G, Kawasaki H, Hasegawa J, Sulindac and a cyclooxygenase-2 inhibitor, etodolac, increase APC mRNA in the colon of rats treated with azoxymethane, 2000, *Gut*, 47, 812-819
- Klan R, Knispel H, Meier T, Acetylsalicylic acid inhibition of *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)-nitrosamine-induced bladder carcinogenesis in rats, 1993, *Cancer Res Clin Oncol*, 119, 482-485
- Klefstrom J, Vastrik I, Saksela E, Valle J, Eilers M, Alitalo K, c- Myc induces cellular susceptibility to the cytotoxic action of TNF- α , 1994, *EMBO J*, 13, 5442-5450
- Klein T, Ullrich V, Pfeilschifter J, Nüsing R, On the induction of cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase and soluble phospholipase A₂ in rat mesangial cells by a nonsteroidal anti-inflammatory drug: the role of cyclic AMP, 1998, *Mol Pharmacol*, 53, 385-391

- Klose J, Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutation in mammals, 1975, *Humangenetik*, 26, 231-243
- Klose J, Kobalz U, Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome, 1995, *Electrophoresis*, 16, 1034-1059
- Koga H, Sakisaka S, Ohishi M, et al., Nuclear DNA fragmentation and expression of Bcl-2 in primary biliary cirrhosis, 1997, *Hepatology*, 25, 1077-1084
- Kondo H, Rabouille C, Newman R, Levine TP, Pappin D, Freemont P, Warren G, p47 is a cofactor for p97-mediated membrane fusion, 1997, *Nature*, 388, 75-78
- Koss K, Harrison RF, Gregory J, Darnton SJ, Anderson MR, Jankowski JA, The metabolic marker tumour pyruvate kinase M2 (tumour M2-PK) shows increased expression along the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence in Barrett's oesophagus, 2004, *J Clin Pathol*, 57, 1156-1159
- Krynetski EY, Krynetskaia NF, Bianchi ME, Evans WE, A nuclear protein complex containing high mobility group proteins B1 and B2, heat shock cognate protein 70, ERp60, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is involved in the cytotoxic response to DNA modified by incorporation of anticancer nucleoside analogues, 2003, *Cancer Res*, 63, 100-106
- Kubota H, Hynes G, Carne A, Ashworth A, Willison K, Identification of six Tcp-1-related genes encoding divergent subunits of the TCP-1-containing chaperonin, 1994, *Curr Biol*, 4, 89-99
- Kudo T, Narisawa T, Abo S, Antitumor activity of indomethacin on methylazoxymethanol-induced large bowel tumors in rats, 1980, *Gann*, 71, 260-264
- Kuroki T, Seki S, Kawakita N, et al., Expression of antigens related to apoptosis and cell proliferation in chronic nonsuppurative destructive cholangitis in primary biliary cirrhosis, 1996, *Virchows Arch*, 429, 119-129
- Kyhse-Andersen J, Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose, 1984, *J Biochem Biophys Meth*, 10, 203-209
- LaBrosse EH, Com-Nougue C, Zucker JM, et al, Urinary excretion of 3-methoxy-4-hydroxymandelic acid and 3-methoxy-4-hydroxyphenylacetic acid by 288 patients with neuroblastoma and related neural crest tumors, 1980, *Cancer Res*, 40, 1995-2001
- Laemmli UK, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, 1970, *Nature*, 227, 680-685
- Lander ES, et al., Initial sequencing and analysis of the human genome, 2001, *Nature*, 409, 860-921
- Landowski TH, Dratz EA, Starkey JR, Studies of the structure of the metastasis-associated 67kDa laminin binding protein; fatty acid acylation and evidence supporting dimerization of the 32kDa gene product to form the mature protein, 1995, *Biochemistry* 34, 11276-11287
- Langman MJ, Cheng KK, Gilman EA, Lancashire RJ, Effect of anti-inflammatory drugs of overall risk of common cancer: case-control study in general practice research database, 2000, *BMJ*, 320, 1642-1646

- Leahy KM, Ornberg RL, Wang Y, Zweifel BS, Koki AT, Masferrer JL, Cyclooxygenase-2 inhibition by celecoxib reduces proliferation and induces apoptosis in angiogenic endothelial cells in vivo, 2002, *Cancer Res*, 62, 625-631
- Lecomte M, Laneuville O, Ji C, DeWitt DL, Smith WL, Acetylation of human prostaglandin endoperoxide synthase-2 (cyclooxygenase-2) by aspirin, 1994, *J Biol Chem*, 269, 13207-13215
- Lee BS, Chen J, Angelidis C, Jurivich DA, Morimoto RI, Pharmacological modulation of heat shock factor 1 by anti-inflammatory drugs results in protection against stress-induced cellular damage, 1995, *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 7207-7211
- Lehmann EP, Neuroblastoma, 1917, *J Med Res*, 36, 309-326
- Lehnert T, Deschner EE, Karmali RA, DeCosse JJ, Effect of flurbiprofen and 16,16-dimethyl-prostaglandin E₂ on gastrointestinal tumorigenesis induced by *N*-methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidine in rats. I. Squamous epithelium and mesenchymal tissue, 1987, *J Natl Cancer Inst*, 78, 923-929
- Levy AP, Levy NS, Goldberg MA, Post-translational regulation of vascular endothelial cell growth factor by hypoxia, 1996, *J Biol Chem*, 271, 2746-2753
- Lewis TS, Shapiro PS, Ahn NG, Signal transduction through MAP kinase cascades, 1998, *Adv Cancer Res*, 74, 49-139
- Lewis VA, Heynes GM, Zhong D, Saibil H, Willison K, T-complex polypeptide-1 is a subunit of a heteromeric particle in the eucaryotic cytosol, 1992, *Nature*, 358, 249-252
- Li LS, Kim H, Rhee H, Kim SH, Shin DH, Chung KY, Park KS, Paik YK, Chang J, Kim H, Proteomic analysis distinguishes basaloid carcinoma as a distinct subtype of nonsmall cell lung carcinoma, 2004, *Proteomics*, 4, 3394-3400
- Li LY, Lou X, Wang X, Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria, 2001, *Nature*, 412, 95-99
- Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X, 1997, *Cell*, 91, 479-489
- Liang P, Pardee AB, Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction, 1992, *Science*, 257, 967-971
- Liu CH, Chang SH, Narko K, Tirfan OC, Wu MT, Smith E, et al., Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice, 2001, *J Biol Chem*, 276, 18563-18569
- Liu RY, Kim D, Yang SH, Li GC, Dual control of heat shock response : involvement of a constitutive heat shock element-binding factor, 1993, *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 3078-3082
- Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X, Induction of apoptotic program in cell-free extracts : requirement for dATP and cytochrome c, 1996, *Cell*, 86, 147-157
- Liu XH, Kirschenbaum A, Lu M, Yao S, Dosoretz A, Holland JF, Prostaglandin E₂ induces hypoxia-inducible factor 1 α stabilization and nuclear localization in a human prostate cancer cell line, 2002, *J Biol Chem*, 277, 50081-50086

- Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Lee R, Holland JF, Levine AC, Inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses angiogenesis and the growth of prostate cancer *in vivo*, 2000, J Urol, 164, 820-825
- Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A, Levine AC, NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells, 1998, Cancer Res, 58, 4245-4249
- Lo AS, Liew CT, Ngai SM, Tsui SK, Fung KP, Lee CY, Waye MM, Developmental regulation and cellular distribution of human cytosolic malate dehydrogenase (MDH1), 2005, J Cell Biochem, 94, 763-773
- Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, Mittmann M, Wang C, Kobayashi M, Horton H, Brown EL, Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays, 1996, Nat Biotechnol, 14, 1675-1680
- Look AT, Hayes FA, Nitschke R, McWilliams NB, Green AA, Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma, 1984, N Engl J Med, 311, 231-235
- Look AT, Hayes FA, Shuster JJ, Douglass EC, Castleberry RP, Bowman LC, Smith EI, Brodeur GM, Clinical relevance of tumor cell ploidy and N-myc gene amplification in childhood neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study, 1991, J Clin Oncol, 9, 581-591
- Lopez MF, Patton WF, Reproducibility of polypeptide spot positions in two-dimensional gels run using carrier ampholytes in the isoelectric focusing dimension, 1997, Electrophoresis, 18, 338-343
- Lottspeich F, Zorbas H (Hrsg.), Bioanalytik, 1998, Spektrum Akademischer Verlag
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ, Protein measurement with the Folin phenol reagent, 1951, J Biol Chem, 193, 265-275
- Lu X, Xie W, Reed D, Bradshaw WS, Simmons DL, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs cause apoptosis and induce cyclooxygenases in chicken embryo fibroblasts, 1995, Proc Natl Acad Sci USA, 92, 7961-7965
- Luo RX, Postigo AA, Dean DC, Rb interacts with histone deacetylase to repress transcription, 1998, Cell, 92, 463-473
- Macdonald P, Palmer J, Kirby JA, Jones DEJ, Apoptosis as a mechanism for cell surface expression of the autoantigen pyruvate dehydrogenase complex, 2004, Clin Exp Immunol, 136, 559-567
- Madeo F, Frohlich E, Ligr M, Grey M, Sigrist SJ, Wolf DH, Frohlich KU, Oxygen stress: a regulator of apoptosis in yeast, 1999, J Cell Biol, 145, 757-767
- Magi B, Ettore A, Liberatori S, Bini L, Andreassi M, Frosali S, Neri P, Pallini V, Di Stefano A, Selectivity of protein carbonylation in the apoptotic response to oxidative stress associated with photodynamic therapy: a cell biochemical and proteomic investigation, 2004, Cell Death Differ, 11, 842-852
- Magnaghi-Jaulin L, Groisman R, Naguibneva I, Robin P, Lorain S, Le Villain JP, Troalen F, Trouche D, Harel-Bellan A, Retinoblastoma protein represses transcription by recruiting a histone deacetylase, 1998, Nature, 391, 601-605

- Mann M, Hojrup P, Roepstorff P, Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases, 1993, 22, 338-345
- Maris JM , Jensen J, Sulman EP, Beltinger CP, Allen C, Biegel JA, Brodeur GM, White PS, Human Kruppel-related 3 (HKR3): a candidate for the 1p36 neuroblastoma tumour suppressor gene?, 1997, Eur J Cancer, 33, 1991-1996
- Maris JM , White PS, Beltinger CP, Sulman EP, Castleberry RP, Shuster JJ, Look AT, Brodeur GM, Significance of chromosome 1p loss of heterozygosity in neuroblastoma, 1995, Cancer Res, 55,4664-4669
- Martinez M, McPherson RS, Levin B, Annegers JF, Aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of colorectal adenomatous polyps among endoscoped individuals, 1995, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 4, 703-707
- Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, Zweifel BS, Settle SL, Woerner BM, Edwards DA, Flickinger AG, Moore RJ, Seibert K, Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors, 2000, Cancer Res, 60, 1306-1311
- Masuda Y, Shima G, Aiuchi T, Horie M, Horie K, Nakajo S, Kajimoto S, Shibayama-Imazu T, Nakaya K, Involvement of tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 (TRAP1) in apoptosis induced by β -Hydroxyisovalerylshikonin, 2004, J Biol Chem, 279, 42503-42515
- Menard S, Castronovo V, Tagliabue E, Sobel ME, New insights into the metastasis-associated 67 kD laminin receptor, 1997, J Cell Biochem, 67, 155-165
- Mercille S, Massie B, Introduction of apoptosis in nutrient-deprived cultures of hybridoma and myeloma cells, 1994, Biotechnol Bioeng, 44, 1140-1154
- Merril CR, Switzer RC, van Keuren ML, Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional-electrophoresis and a highly sensitive silver stain, 1979, Proc Natl Acad Sci USA, 76, 4335-4339
- Metzger U, Meier J, Uhlschmid G, Weihe H, Influence of various prostaglandin synthesis inhibitors on DMH-induced rat colon cancer, 1984, Din Colon Rectum, 27, 366-369
- Meyer HH, Shorter JG, Seemann J, Pappin D, Warren GA, A complex of mammalian Ufd1 and Npl4 links the AAA-ATPase, p97, to ubiquitin and nuclear transport pathways, 2000, EMBO J, 19, 2181-2192
- Meyer HH, Wang Y, Warren G, Direct binding of ubiquitin conjugates by the mammalian p97 adaptor complexes, p47 and Ufd1-Npl4, 2002, EMBO J, 21, 5645-5652
- Meyer TS, Lamberts BL, Use of coomassie brilliant blue R-250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide-gel-strips, 1965, Biochim Biophys Acta, 107, 144-145
- Miki K, Eddy EM, Tumor necrosis factor receptor 1 is an ATPase regulated by silencer death domain, 2002, Mol Cell Biol, 22, 2536-2543
- Mohammad RM, Hamdan MY, Maki A, Al-Katib A, Induced expression of alpha-enolase in differentiated diffuse large cell lymphoma, 1994-95, Enzyme Prot, 48, 37-44
- Molloy MP, Herbert B, Walsh BJ, Tyler MI, Traini M, Sanchez JC, Hochstrasser DF, Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional electrophoresis, 1998, Electrophoresis, 19, 837-844

- Moorghen M, Ince P, Finney KJ, Sunter JP, Appleton DR, Watson AJ, A protective effect of sulindac against chemically-induced primary colonic tumours in mice, 1988, *J Pathol*, 156, 341-347
- Morbidelli L, Donnini S, Ziche M, Role of nitric oxide in the modulation of angiogenesis, 2003, *Curr Pharm Des*, 9, 521-530
- Morrison DK, Cutler RE, The complexity of Raf-1 regulation, 1997, *Curr Opin Cell Biol*, 9, 174-179
- Mosmann T, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, 1983, *J Immunol Methods*, 65, 55-63
- Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Denis-Larose C, Massie B, Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis, 1997, *Mol Cell Biol*, 17, 5317-5327
- Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Meriin AB, Sherman MY, Morimoto RI, Massie B, The chaperone function of hsp70 is required for protection against stress-induced apoptosis, 2000, *Mol Cell Biol*, 20, 7146-7159
- Mullis KB, Faloona F, Scharf SJ, Saiki RK, Horn GT, Erlich HA, Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction, 1986, *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 51, 263-273
- Mullis KB, Faloona F, Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction, 1987, *Methods Enzymol*, 155, 335-350
- Mullis KB, The unusual origin of the polymerase chain reaction, 1990, *Sci Am*, 262, 56-61, 64-65
- Multhoff G, Botzler C, Wiesnet M, Muller E, Meier T, Wilmanns W, A stress-inducible 72 kDa heat shock protein (Hsp72) is expressed on the surface of human tumor cells but not on normal cells, 1995, *Int J Cancer*, 61, 272-279
- Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M, *Arzneimittelwirkungen – Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, 2001, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart
- Nagy Z, Mechanisms of neuronal death in down's syndrome, 1999, *J Neural Transm Suppl*, 57, 233-245
- Nakatsugi S, Ohta T, Kawamori T, Mutoh M, Tanigawa T, Watanabe K, et al., Chemoprevention by nimesulide, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol[4,5-*b*]pyridine (PhIP)-induced mammary gland carcinogenesis in rats, 2000, *Jpn Cancer Res*, 91, 886-892
- Narisawa T, Sato M, Tani M, Takahashi T, Goto A, Inhibition of development of methylnitrosourea-induced rat colon tumors by indomethacin treatment, 1981, *Cancer Res*, 41, 1954-1957
- Nelson DL, Cox MM, *Lehninger Biochemie*, 2001, Springer Verlag, Berlin
- Neuhoff V, Arnold N, Taube D, Erhardt W, Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250, 1988, *Electrophoresis*, 9, 255-262

- Neuhoff V, Stamm R, Eibl H, Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: a systematic analysis, 1985, *Electrophoresis*, 6, 427-448
- Nevins JR, The Rb/E2F pathway and cancer, 2001, *Hum Mol Genet*, 10, 699-703
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C, A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry, 1991, *J Immunol Methods*, 139, 271-279
- Njoroge FG, Taveras AG Kelly J, Remiszewski S, et al., (+)-4-[2-[4-(8-Chloro-3,10-dibromo-6,11-dihydro-5H-benzo[5,6]cyclohepta[1,2-b]-pyridin-11®-yl)-1-piperidiny]-2-oxo-ethyl]-1-piperidinecarboxamide (SCH-66336): a very potent farnesyl protein transferase inhibitor as a novel antitumor agent, 1998, *J Med Chem*, 41, 4890-4902
- Norrish AE, Jackson RT, McRae CU, Non-steroidal anti-inflammatory drugs and prostate cancer progression, 1998, *Int J Cancer*, 77, 511-515
- O'Banion MK, Sadowski HB, Winn V, et al., A serum- and glucocorticoid-regulated 4-kilobase mRNA encodes a cyclooxygenase-related protein, 1991, *J Biol Chem*, 266, 23261-23267
- O'Farrell PH, High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins, 1975, *J Biol Chem*, 250, 4007-4021
- Ohlsen M, Jonsson R, Brokstad KA, Subcellular redistribution and surface expression of the Ro52, Ro60 and La48 autoantigens during apoptosis in human ductal epithelial cells: a possible mechanism in the pathogenesis of Sjogren's syndrome, 2002, *Scand J Immunol*, 56, 456-469
- Oka K, Mori N, Haimoto H, Kato K, Expression of enolases in B-cell tumors, 1989, *Lab Invest*, 60, 38-44
- Okajima A, Denda A, Ozono S, Takahama M, Akai H, Sasaki Y, et al., Chemopreventive effects of nimesulide, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, on the development of rat urinary bladder carcinomas initiated by *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine, 1998, *Cancer Res*, 58, 3028-3031
- Oremek GM, Sapoutzis N, Kramer W, Bickeboller R, Jonas D, Value of tumor M2 (Tu M2-PK) in patients with renal carcinoma, 2000, *Anticancer Res*, 20, 5095-5098
- Osborn MT, Chambers TC, Role of the stress-activated/c-Jun NH₂-terminal protein kinase pathway in the cellular response to adriamycin and other chemotherapeutic drugs, 1996, *J Biol Chem*, 271, 30950-30955
- Ovchinnikov LP, Motuz LP, Natapov PG, Averbuch LJ, Wettenhall RE, Szyszka R, Kramer G, Hardesty B, Three phosphorylation sites in elongation factor 2, 1990, *FEBS Lett*, 275, 209-212
- Ozaki I, Yamamoto K, Mizuta T, Kajihara S, Fukushima N, Setoguchi Y, Morito F, Sakai T, Differential expression of laminin receptors in human hepatocellular carcinoma, 1998, *Gut*, 43, 837-842
- Paganini-Hill A, Chao A, Ross R, Henderson B, Aspirin use and chronic diseases: a cohort study of the elderly, 1989, *Br Med J*, 299, 1247-1250

- Pahl HL, Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors, 1999, *Oncogene*, 18, 6853-6866
- Pai R, Szabo IL, Soreghan BA, Atay S, Kawanaka H, Tarnawski AS, PGE2 stimulates VEGF expression in endothelial cells via ERK2/JNK1 signaling pathways, 2001, *Biochem Biophys Res Commun*, 286, 923-928
- Palter KB, Watanabe M, Stinson L, Mahowald AP, Craig EA, Expression and localization of drosophila melanogaster hsp70 cognate proteins, 1986, *Mol Cell Biol*, 6, 1187-1203
- Pappin DJ, Hojrup P, Bleasby AJ, Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting, 1993, *Curr Biol*, 3, 327-332
- Pei DP, Han Y, Narayan D, Herz D, Ravikumar TS, Expression of 32-kDa laminin-binding protein mRNA in colon cancer tissues, 1994, *J Surg Res*, 61, 120-126
- Peleg I, Maibach H, Brown SH, Wilcox CM, Aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drug use and the risk of subsequent colorectal cancer, 1994, *Arch Intern Med*, 154, 394-399
- Peschel RE, Chen M, Seashore J, The treatment of massive hepatomegaly in stage IV-S neuroblastoma, 1991, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 7, 549-553
- Peterson WL, Cryer B, COX-1-sparing NSAIDs – is the enthusiasm justified?, 1999, *JAMA*, 282, 1961-1963
- Pierce JW, Read MA, Ding H, Luscinskas FW, Collins T, Salicylates inhibit I κ B α phosphorylation, endothelial-leukocyte adhesion molecule expression, and neutrophil transmigration, 1996, *J Immunol*, 156, 3961-3969
- Piguet PF, Vesin C, Guo J, Donati Y, Barazzzone C, TNF-induced enterocytes apoptosis in mice is mediated by TNF receptor I and does not require p53, 1998, *Eur J Immunol*, 28 3499-3505
- Piqué M, Barragán M, Dalmau M, Bellosillo B, Pons G, Gil J, Aspirin induces apoptosis through mitochondrial cytochrome c release, 2000, *FEBS Lett*, 480, 193-196
- Pollard M, Luckert PH, Effect of piroxicam on primary intestinal tumors induced in rats by N-methylnitrosourea, 1984, *Cancer Lett*, 25, 117-121
- Pollard M, Luckert PH, Treatment of chemically-induced intestinal cancers with indomethacin, 1981, *Proc Soc Exp Bio Med*, 167, 161-164
- Posch A, Weiss W, Wheeler C, Dunn MJ, Görg A, Sequence analysis of wheat grain allergens separated by two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients, 1995, *Electrophoresis*, 16, 1115-1119
- Powell LM, Wallis SC, Pease RJ, Edwards YH, Knott TJ, Scott J, A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine, 1987, *Cell*, 50, 831-840
- Preis PN, Saya H, Nadasdi L, Hochhaus G, Levin V, Sadee W, Neuronal cell differentiation of human neuroblastoma cells by retinoic acid plus herbimycin A, 1988, *Cancer Res*, 48, 6530-6534
- Price NT, Redpath NT, Severinov KV, Campbell DG, Russell JM, Proud CG, Identification of the phosphorylation sites in elongation factor-2 from rabbit reticulocytes, 1991, *FEBS Lett*, 282, 253-258

- Pugh CW, Ratcliffe PJ, Regulation of angiogenesis by hypoxia : role of the HIF system, 2003, *Nat Med*, 9, 677-684
- Rabilloud T (Ed.), Proteome research: Two-dimensional gel electrophoresis and identification methods, 2000, Springer
- Rabilloud T, A comparison between low background silver diammine and silver nitrate protein stains, 1992, *Electrophoresis*, 13, 429-439
- Rabilloud T, Adessi C, Giraudel A, Lunardi J, Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients, 1997, *Electrophoresis*, 18, 307-316
- Rabilloud T, Hubert M, Tarroux P, Procedures for two-dimensional electrophoretic analysis of nuclear proteins, 1986, *J Chromatogr*, 351, 77-89
- Rabilloud T, Mechanisms of protein silver staining in polyacrylamide gels: a 10-year synthesis, 1990, *Electrophoresis*, 11, 785-794
- Rabilloud T, Use of thiourea to increase the solubility of membrane proteins in two-dimensional electrophoresis, 1998, *Electrophoresis*, 19, 758-760
- Rabilloud T, Valette C, Lawrence JJ, Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilised pH-gradients in the first dimension, 1994, *Electrophoresis*, 15, 1552-1558
- Rabilloud T, Vuillard L, Gilly C, Lawrence JJ, Silver-staining of proteins in polyacrylamide gels: a general overview, 1994, *Cell Mol Biol*, 40, 57-75
- Rajapandi T, Greene LE, Eisenberg E, The molecular chaperones Hsp90 and Hsc 70 are both necessary and sufficient to activate hormone binding by glucocorticoid receptor, 2000, *J Biol Chem*, 275, 22597-22604
- Rao CN, Barsky SH, Terranova VP, Liotta LA, Isolation of tumor cell laminin receptor, 1983, *Biochem Biophys Res Commun*, 111, 804-808
- Rao CV, Rivenson A, Simi B, Zang E, Kelloff G, Steele V, et al., Chemoprevention of colon carcinogenesis by sulindac, a nonsteroidal antiinflammatory agent, 1995, *Cancer Res*, 55, 1464-1472
- Rape M, Hoppe T, Gorr I, Kalocay M, Richly H, Jentsch S, Mobilization of processed, membrane-tethered SPT23 transcription factor by CDC48(UFD1/NPL4), an ubiquitin-selective chaperone, 2001, *Cell*, 107, 667-677
- Read SM, Northcote DH, Minimization of variation in the response of different proteins to the Coomassie Blue G dye-binding assay for protein, 1981, *Anal Biochem*, 116, 53-64
- Reddy BS, Maruyama H, Kelloff G, Dose-related inhibition of colon carcinogenesis by dietary piroxicam, a nonsteroidal antiinflammatory drug, during different stages of rat colon tumor development, 1987, *Cancer Res*, 47, 5340-5346
- Reddy BS, Rao CV, Rivenson A, Kelloff G, Inhibitory effect of aspirin on azoxymethane-induced colon carcinogenesis in F344 rats, 1993, *Carcinogenesis*, 14, 1493-1497
- Reddy BS, Rao CV, Seibert K, Evaluation of cyclooxygenase-2 inhibitor for potential chemopreventative properties In colon carcinogenesis, 1996, *Cancer Res*, 56, 4566-4569

- Redpath NT, Price NT, Severinov KV, Proud CG, Regulation of elongation factor-2 by multisite phosphorylation, 1993, *Eur J Biochem*, 213, 689-699
- Reed JC, Jurgenmeier JM, Matsuyama S, Bcl-2 family proteins and mitochondria, 1998, *Biochim Biophys Acta*, 1366, 127-137
- Reeves MJ, Newcomb PA, Trentham-Diez A, Storer BE, Remington P, Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and the protection against colorectal cancer in women, 1996, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 5, 955-960
- Remacha M, Jimenez-Diaz A, Bermejo B, Rodriguez-Gabriel MA, Guarinos E, Ballesta JPG, Ribosomal acidic phosphoproteins P1 and P2 are not required for cell viability but regulate the pattern of protein expression in *Saccharomyces cerevisiae*, 1995, *Mol Cell Biol*, 15, 4754-4762
- Ren H, Tai SH, Khuri F, Mao L, Farnesyltransferase inhibitor SCH66336 induces rapid phosphorylation of eukaryotic translation elongation factor 2 in head and neck squamous cell carcinoma cells, 2005, *Cancer Res*, 65, 5841-5847
- Rice PL, Goldberg RJ, Ray EC, Driggers LJ, Ahnen DJ, Inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1 / 2 phosphorylation and induction of apoptosis by sulindac metabolites, 2001, *Cancer Res*, 61, 1541-1547
- Rioux N, Castonguay A, Prevention of NNK-induced lung tumorigenesis in A/J mice by acetylsalicylic acid and NS-398, 1998, *Cancer Res*, 58, 5354-5360
- Rodriguez C, Henley SJ, Calle EE, Thun MJ, Paracetamol and risk of ovarian cancer mortality in a prospective study of women in the USA [letter], 1998, *Lancet*, 352, 1354-1355
- Roigas J, Deger S, Schroeder J, Wille A, Turk I, Brux B, Jung K, Schnorr D, Loening SA, Tumor type M2 pyruvate kinase expression in metastatic renal cell carcinoma, 2003, *Urol Res*, 31, 358-362
- Ross CD, Gomaa MA, Gillies E, Juengel R, Medina JE, Tumor grade, microvessel density, and activities of malate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, and hexokinase in squamous cell carcinoma, 2000, *Otolaryngol Head Neck Surg*, 122, 195-200
- Roswell DF, White EH, The chemiluminescence of luminol and related hydrazides, 1978, *Methods Enzymol*, 133, 331-353
- Roy L, Bergeron JJ, Lavoie C, Hendriks R, Gushue J, Fazel A, Pelletier A, Morre DJ, Subramaniam VN, Hong W, Paiement J, Role of p97 and Syntaxin5 in the assembly of transitional endoplasmic reticulum, 2000, *Mol Biol Cell*, 11, 2529-2542
- Royds JA, Parsons MA, Taylor CB, Timperley WR, Enolase isoenzymes distribution in the human brain and its tumors, 1982, *J Pathol*, 137, 37-49
- Rozen S, Skaletsky H, Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers, 2000, *Methods Mol Biol*, 132, 365-386
- Rozic JG, Chakraborty C, Lala PK, Cyclooxygenase inhibitors retard murine mammary tumor progression by reducing tumor cell migration, invasiveness and angiogenesis, 2001, *Int J Cancer*, 93, 497-506

- Rubio E, Valenciano AI, Segundo C, Sánchez N, de Pablo F, de la Rosa EJ, Programmed cell death in the neurulation embryo is prevented by the chaperone heat shock cognate 70, 2002, *Eur J Neurosci*, 15, 1646-1654
- Runyan RB, Versalovic J, Shur BD, Functionally distinct laminin receptors mediate cell adhesion and spreading. The requirement for surface galactosyl-transferase in cell spreading, 1988, *J Cell Biol*, 107, 1863-1871
- Ryazanov AG, Davydova EK, Mechanism of elongation factor 2 (EF-2) inactivation upon phosphorylation. Phosphorylated EF-2 is unable to catalyze translocation, 1989, *FEBS Lett*, 251, 187-190
- Rydzziel S, Delany AM, Canalis E, AU-rich elements in the collagenase 3 mRNA mediate stabilization of the transcript by cortisol in osteoblasts, 2004, *J Biol Chem*, 279, 5397-5404
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA, Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, 1988, *Science*, 239, 487-491
- Saiki RK, Scharf SJ, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N, Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia, 1985, *Science*, 230, 1350-1354
- Sanchez JC, Rouge V, Pisteur M, Ravier F, Tonella L, Moosmayer M, Wilkins MR, Hochstrasser D, Improved and simplified in-gel sample application using reswelling of dry immobilized pH gradients, 1997, *Electrophoresis*, 18, 324-327
- Sanders MM, Groppi VE, Browning ET, Resolution of basic cellular proteins including histone variants by two-dimensional gel electrophoresis: evaluation of lysine to arginine ratios and phosphorylation, 1980, *Anal Biochem*, 103, 157-165
- Sandler RS, Galanko JC, Murray SC, Helm JF, Woosley JT, Aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk for colorectal adenomas, 1998, *Gastroenterology*, 114, 441-447
- Sandler RS, Halabi S, Baron JA, Budinger S, Paskett E, Keresztes R, Petrelli N, Pipas JM, Karp DD, Loprinzi CL, Steinbach G, Schilsky R, A randomised trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer, 2003, *N Engl J Med*, 348, 883-890
- Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, Hutchison CA, Slocombe PM, Smith M, Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA, 1977, *Nature*, 265, 687-695
- Santos AM, Sarfeh IJ, Tarnawski A, Tanoue K, Wahlstrom KJ, Knudson KL, Irwin FL, Quina, Indomethacin inhibits nitric oxide synthase mRNA and protein expression in the gastric mucosa. A key to its injurious action?, 1995, *Gastroenterology*, 108, A208
- Sapozhnikov AM, Gusarova GA, Ponomarev ED, et al., Translocation of cytoplasmatic HSP70 onto the surface of EL-4 cells during apoptosis, 2002, *Cell Prolif*, 35, 193-206
- Scharte M, Han X, Bertges DJ, Fink MP, Delude RL, Cytokines induce HIF-1 DNA binding and the expression of HIF-1-dependent genes in cultured rat enterocytes, 2003, *AJP-Gastrointest Liver Physiol*, 284, 373-384
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO, Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray, 1995, *Science*, 270, 467-470

- Schmechel D, Marangos P, Brightman M, Neuron-specific enolase is a molecular marker for peripheral and central neuroendocrine cells, 1978, *Nature*, 276, 834-836
- Schmechel DE, Brightman MW, Marangos PJ, Neurons switch from non-neuronal enolase to neuron-specific enolase during differentiation, 1980, *Brain Res*, 190, 195-214
- Schneider J, Neu K, Velcovsky HG, Morr H, Eigenbrodt E, Tumor M2-pyruvate kinase in the follow-up of inoperable lung cancer patients: a pilot study, 2003, *Cancer Lett*, 193, 91-98
- Schrattenholz A, Methoden der Proteomforschung – Molekulare Analyse der Proteinexpression, 2001, Spektrum Akademischer Verlag
- Schreinemachers DM, Everson RB, Aspirin use and lung, colon, and breast cancer incidence in a prospective study, 1994, *Epidemiology*, 5, 138-146
- Schwab M, Alitalo K, Klempnauer KH, Varmus HE, Bishop JM, Gilbert F, Brodeur G, Goldstein M, Trent JM, Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour, 1983, *Nature*, 305, 245-248
- Schwab M, Where pathology meets molecular biology: N-myc amplification in human neuroblastoma as a paradigm for the clinical use of an oncogene alteration, 1994, *Verh Dtsch Ges Pathol*, 78, 26-33
- Schweer H, Watzer B, Seyberth HW, Determination of seven prostanoids in 1 ml of urine by gas chromatography-negative ion chemical ionization triple stage quadrupole mass spectrometry, 1994, *J Chromatogr*, 652, 221-227
- Schweer H, Watzer B, Seyberth HW, Nusing RM, Improved quantification of 8-epi-prostaglandin F2 alpha and F2-isoprostanes by gas chromatography/triple-stage quadrupole mass spectrometry: partial cyclooxygenase-dependent formation of 8-epi-prostaglandin F2 alpha in humans, 1997, *J Mass Spectrom*, 32, 1362-1370
- Schwenger P, Alpert D, Skolnik EY, Vilcek J, Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by sodium salicylate leads to inhibition of tumor necrosis factor-induced IkappaB alpha phosphorylation and degradation, 1998, *Mol Cell Biol*, 18, 78-84
- Segers J, Rabaey M, DeBruyne G, Bracke M, Mareel M, Protein degradation during different extraction procedures in malignant cells, 1986, Dunn MJ (ed) *Electrophoresis '86*, VCH, Weinheim, pp 642- 645
- Sellers WR, Rodgers JW, Kaelin WJ, A potent transrepression domain in the retinoblastoma protein induces a cell cycle arrest when bound to E2F sites, 1995, *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 11544-11548
- Sharpe CR, Collet JP, McNutt M, Belzile E, Boivin JF, Hanley JA, Nested case-control study of the effects of non-steroidal anti-inflammatoxy drugs on breast cancer risk and stage, 2000, *Br J Cancer*, 83, 112-120
- Shen J, Person MD, Zhu J, Abbruzzese JL, Li D, Protein expression profiles in pancreatic adenocarcinoma compared with normal pancreatic tissue and tissue affected by pancreatitis as detected by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry, 2004, *Cancer Res*, 64, 9018-9026
- Sheng H, Shao J, Morrow JD, Beauchamp RD, DuBois RN, Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells, 1998, *Cancer Res*, 58, 362-366

- Sherr CJ, Cancer cell cycles, 1996, *Science*, 274, 1672-1677
- Shibata MA, Hirose M, Masuda A, Kato T, Mutai M, Ito M, Modification of BHA forestomach carcinogenesis in rats: inhibition by diethylmaleate or indomethacin and enhancement by a retinoid, 1993, *Carcinogenesis*, 14, 1265-1269
- Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y, Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC, 1999, *Nature*, 399, 483-487
- Shin BK, Wang H, Yim AM, Le Naour F, Brichory F, Jang JH, Zhao R, Puravs E, Tra J, Michael CW, Misek DE, Hanash SM, Global profiling of the cell surface proteome of cancer cells uncovers an abundance of proteins with chaperone function, 2003, *J Biol Chem*, 278, 7607-7616
- Shirogane T, Fukada T, Muller JM, Shima DT, Hibi M, Hirano T, Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis, 1999, *Immunity*, 11, 709-719
- Shureiqi I, Chen D, Lee JJ, Yang P, Newman RA, Brenner DE, Lotan R, Fischer SM, Lippman SM, 15-LOX-1: a novel molecular target of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis in colorectal cancer cells, 2000, *J Natl Cancer Inst*, 92, 1136-1142
- Shureiqi I, Chen D, Lotan R, Yang P, Newman RA, Fischer SM, Lippman SM, 15-Lipoxygenase-1 mediates nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis independently of cyclooxygenase-2 in colon cancer cells, 2000, *Cancer Res*, 60, 6846-6850
- Shureiqi I, Xu X, Chen D, Lotan R, Morris JS, Fischer SM, Lippman SM, Nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis in esophageal cancer cells by restoring 15-Lipoxygenase-1 expression, 2001, *Cancer Res*, 61, 4879-4884
- Singh P, Coe J, Hong WA, A role for retinoblastoma protein in potentiating transcriptional activation by the glucocorticoid receptor, 1995, *Nature*, 374, 562-565
- Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, Wang HG, Reed JC, Nicholson DW, Alnemri ES, Green DR, Martin SJ, 1999, *J Cell Biol*, 144, 281-292
- Smalley W, Ray WA, Daugherty J, Griffin MR, Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and incidence of colorectal cancer, 1999, *Arch Intern Med*, 159, 161-166
- Sobel ME, Differential expression of the 67 kDa laminin receptor in cancer, 1993, *Semin Cancer Biol*, 4, 311-317
- Somiari RI, Sullivan A, Russell S, Somiari S, Hu H, Jordan R, Gorge A, Katenhusen R, Buchowiecka A, Arciero C, Brzeski H, Hooke J, Shriver C, High-throughput proteomic analysis of human infiltrating ductal carcinoma of the breast, 2003, *Proteomics*, 3, 1863-1873
- Song HY, Dunbar JD, Donner DB, Aggregation of the intracellular domain of the type 1 tumor necrosis factor receptor defined by the two-hybrid system, 1994, *J Biol Chem*, 269, 22492-22495
- Song HY, Dunbar JD, Zhang YX, Guo, Donner DB, Identifikation of a protein with homology to hsp90 that binds the type 1 tumor necrosis factor receptor, 1995, *J Biol Chem*, 270, 3574-3581
- Southern EM, Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis, 1975, *J Mol Biol*, 98, 503-517

- Spector T, Refinement of the Coomassie Blue method of protein quantitation. A simple and linear spectrophotometric assay for < 0.5 to 50 µg of protein, 1978, *Anal Biochem*, 86, 142-146
- Spinola SM, Cannon JG, Different blocking agents cause variation in the immunologic detection of proteins transferred to nitrocellulose membranes, 1985, *J Immunol Methods*, 81, 161-165
- Stryer L, Biochemie, 1999, Spektrum Akademischer Verlag
- Stuart JK, Myszkowski DG, Joss L, Mitchell RS, McDonald SM, Xie Z, Takayama S, Reed JC, Ely KR, Characterization of interactions between the anti-apoptotic protein BAG-1 and Hsc70 molecular chaperones, 1998, *J Biol Chem*, 273, 22506-22514
- Surh CD, Coppel R, Gershwin ME, Structural requirement for autoreactivity on human pyruvate dehydrogenase-E2, the major autoantigen of primary biliary cirrhosis. Implication for a conformational autoepitope, 1990, *J Immunol*, 144, 3367-3374
- Susin SA, Lorenzo HK, Zampami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, et al., Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor, 1999, *Nature*, 397, 441-446
- Switzer RC, Merrill CR, Shifrin S, A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels, 1979, *Anal Biochem*, 98, 231-237
- Szabo IL, Pai R, Soreghan B, Jones MK, Baatar D, Kawanaka H, Tarnawski AS, NSAIDs inhibit the activation of egr-1 gene in microvascular endothelial cells. A key inhibition of angiogenesis?, 2001, *J Physiol (Paris)*, 95, 379-383
- Takashima M, Kuramitsu Y, Yokoyama Y, Iizuka N, Fujimoto M, Nishisaka T, Okita K, Oka M, Nakamura K, Overexpression of alpha enolase in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: association with tumor progression as determined by proteomic analysis, 2005, *Proteomics*, 5, 1686-1692
- Takayama S, Bimston DN, Matsuzawa S, Freeman BC, Aime-Sempe C, Xie Z, Morimoto RI, Reed JC, BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70, 1997, *EMBO J*, 16, 4887-4896
- Takayama S, Sato T, Krajewski S, Kochel K, Irie S, Millan JA, Reed JC, Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity, 1999, *Cell*, 80, 279-284
- Takeda O, Handa M, Uehara T, Maseki N, Sakashita A, Sakurai M, Kanda N, Arai Y, Kaneko Y, An increased NM23H1 copy number may be a poor prognostic factor independent of LOH on 1p in neuroblastoma, 1996, *Br J Cancer*, 74, 1620-1626
- Takeda S, Nagato Y, Yamamura M, Effect of cyclic polylactates on tumour cells and tumour bearing mice, 1997, *Biochem Mol Biol Int*, 43, 9-17
- Tan X, Martin SJ, Green DR, Wang JYJ, Degradation of retinoblastoma protein in tumor necrosis factor- and CD95-induced cell death, 1997, *J Biol Chem*, 272, 9613-9616
- Tanaka M, Narumi K, Isemura M, Abe M, Sato Y, Abe T, Saijo Y, Nukiwa T, Satoh K, Expression of 37-kDa laminin binding protein in murine lung tumor cell correlates with tumor angiogenesis, 2000, *Cancer Lett*, 153, 161-168

- Tanaka T, Inazawa J, Nakamura Y, Molecular cloning and mapping of a human cDNA for cytosolic malate dehydrogenase (MDH1), 1996, *Genomics*, 32, 128-130
- Tavani A, Gallus S, La Vecchia C, Conti E, Montella M, Francheschi S, Aspirin and ovarian cancer: an Italian case-control study, 2000, *Ann Oncol*, 11, 1171-1173
- Taylor MT, Lawson KR, Ignatenko NA, Marek SE, Stringer DE, Skovan BA, Gerner EW, Sulindac sulfone inhibits K-ras-dependent cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer, 2000, *Cancer Res*, 60, 6607-6610
- Tew KD, Monks A, Barone L, Rosser D, Akerman G, Montali JA, Wheatley JB, Schmidt Jr. DE, Glutathione-associated enzymes in the human cell lines of the National Cancer Institute Drug Screening Programm, 1996, *Mol Pharmacol*, 50, 149-159
- The C. elegans sequencing consortium, Genome Sequence of the Nematode *C. elegans*: A Platform for Investigating Biology, 1998, *Science*, 282, 2012-2018
- Thornberry NA, Lazebnik Y, Caspases: enemies within, 1998, *Science*, 281, 1312-1316
- Thorpe GHG, Kricka, LJ, Enhanced chemiluminescent reactions catalysed by horseradish peroxidase, 1986, *Methods Enzymol*, 133, 331-353
- Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CJ Jr., Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer, 1991, *N Engl J med*, 325, 1593-1596
- Thurman WG, Ferbach DJ, Sullivan MP, Cyclophosphamide therapy in childhood neuroblastoma, 1964, *N Eng J Med*, 270, 1336-1340
- Tohgo A, Takasawa S, Munakata H, Yonekura H, Hayashi N, Okamoto H, Structural determination and characterization of a 40kDa protein isolated from rat 40S ribosomal subunit, 1994, *FEBS Lett*, 340, 133-138
- Towbin H, Gordon J, Immunoblotting and dot immunobinding – Current status and outlook, 1984, *J Immun Meth*, 72, 313-340
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications, 1979, *Proc Nat Acad Sci USA*, 76, 4350-4354
- Tremblay C, Dore M, Bochsler P, Sirois J, Induction of prostaglandin G/H synthase-2 in a canine model of spontaneous prostatic adenocarcinoma, 1999, *J Natl Cancer Inst*, 91, 1398-1403
- Tsai MY, Wang C, Uncoupling of peptide-stimulated ATPase and clathrin-uncoating activity in deletion mutant of hsc70, 1994, *J Biol Chem*, 269, 5958-5062
- Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN, Cyclooxygenase regulates angiogeneisi induced by colon cancer cells, 1998, *Cell*, 93, 705-716
- Tsukahara F, Maru Y, Identification of novel nuclear export and nuclear localization-related signals in human heat shock cognate protein 70, 2004, *J Biol Chem*, 279, 8867-8872
- Tsukahara F, Yoshioka T, Muraki T, Molecular and functional characterization of HSC54, a noval variant of human heat-shock cognate protein 70, 2000, *Mol Pharmacol*, 58, 1257-1263

- Tsuneyama K, Van de Water J, Leung PS, et al., Abnormal expression of the E2 component of the pyruvate dehydrogenase complex on the luminal surface of biliary epithelium occurs before major histocompatibility complex class II and BB1/B7 expression, 1995, *Hepatology*, 21, 1031-1037
- Uchiumi T, Kikuchi M, Terao K, Iwasaki K, Ogata K, Cross-linking of elongation factor 2 to rat-liver ribosomal proteins by 2-iminothiolane, 1986, *Eur J Biochem*, 156, 37-48
- Uchiumi T, Wahba AJ, Traut RR, Topography and stoichiometry of acidic proteins in large ribosomal subunits from *Artemia salina* as determined by crosslinking, 1987, *Proc Natl Acad Sci USA*, 84, 5580-5584
- Uchiyama K, Jokitalo E, Kano F, Murata M, Zhang X, Canas B, Newman R, Rabouille C, Pappin D, Freemont P, Kondo H, VCIP135, a novel essential factor for p97/p47-mediated membrane-fusion, is required for Golgi and ER assembly in vivo, 2002, *J Cell Biol*, 159, 855-866
- Uchiyama K, Jokitalo E, Lindman M, Jackman M, Kano F, Murata M, Zhang X, Kondo H, The localization and phosphorylation of p47 are important to Golgi disassembly-assembly during the cell cycle, *J Cell Biol*, 161, 1067-1079
- Ugurel S, Bell N, Sucker A, Zimpfer A, Rittgen W, Schadendorf D, Tumor type M2 pyruvate kinase (TuM2-PK) as a novel plasma tumor marker in melanoma, 2005, *Int J Cancer*
- van Loo G, Schotte P, van Gurp M, Demol H, Hoorelbeke B, Gevaert K, et al., Endonuclease G : a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation, 2001, *Cell Death Differ*, 8, 1136-1142
- van Loo G, van Gurp M, Depuydt B, Srinivasula SM, Rodriguez I, Alnemri ES, et al., The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi/HtrA2 interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity, 2002, *Cell Death Differ*, 9, 20-27
- Vane JR, Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs, 1971, *Nat New Biol*, 231, 232-235
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW, Serial analysis of gene expression, 1995, *Science*, 270, 484-487
- Venter JC, et al., The sequence of the human genome, 2001, *Science*, 291, 1304-1351
- Ventrucci M, Cipolla A, Racchini C, Casadei R, Simoni P, Gullo L, Tumor M2-pyruvate kinase, a new metabolic marker for pancreatic cancer, 2004, *Dig Dis Sci*, 49, 1149-1155
- Vidal F, Aragonés J, Alfranca A, de Landazuri MO, Upregulation of vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 after endothelial denudation: role of transcription factor Egr-1, 2000, *Blood*, 95, 3387-3395
- Vilček J, Lee TH, Tumor necrosis factor, 1991, *J Biol Chem*, 266, 7313-7316
- Virchow R, Hyperplasie der Zirbel und der Nebennieren, 1864-1865, *Die Krankhaften Geschwulste*, Hirschwald, Berlin, 65
- Vorm O, Mann M, Improved mass accuracy in matrix assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry of peptides, 1994, *J Am Soc Mass Spec*, 5, 955-958

- Vriezen N, van Dijken JP, Subcellular localization of enzyme activities in chemostat-grown murine myeloma cells, 1998, *J Biotechnol*, 61, 43-56
- Wada RK, Seeger RC, Brodeur GM, Einhorn PA, Rayner SA, Tomayko MM, Reynolds CP, Human neuroblastoma cell lines that express N-myc without gene amplification, 1993, *Cancer*, 72, 3346-3354
- Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS, NF- κ B anti-apoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation, 1998, *Science*, 281, 1680-1683
- Wang HG, Takayama S, Rapp UR, Reed JC, Bcl-2 interacting protein, BAG-1, binds to and activates the kinase Raf-1, 1996, *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 7063-7068
- Wang TF, Chang J, Wang C, Identification of peptide binding domain of hsc70, 1993, *J Biol Chem*, 268, 26049-26051
- Wang TH, Wang HS, Ichijo H, Giannakakou P, Foster JS, Fojo T, Wimalasena J, Microtubule- interfering agents activate c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase through both Ras and apoptosis signal-regulating kinase pathways, 1998, *J Biol Chem*, 273, 4928-4936
- Wang Y, Middleton F, Horton JA, Reichel L, Farnum CE, Damron TA, Microarray analysis of proliferative and hypertrophic growth plate zones identifies differentiation markers and signal pathways, 2004, *Bone*, 35, 1273-1293
- Wang Y, Satoh A, Warren G, Meyer HH, VCIP135 acts as a deubiquitinating enzyme during p97-p47-mediated reassembly of mitotic Golgi fragments, 2004, *J Cell Biol*, 164, 973-978
- Warburg O, On respiratory impairment in cancer cells, 1956, *Science*, 124, 269-270
- Warner TD, Mitchell JA, Cyclooxygenase-3 (COX-3): Filling in the gaps toward a COX continuum?, 2002, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 13371-13373
- Washizu T, Azakami D, Bonkobara M, Washizu M, Araai T, Changes in activities of enzymes related to energy metabolism in testicular tissues of dogs with seminoma, 2002, *Vet Res Commun*, 26, 347-352
- Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphrey-Smith I, Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*, 1995, *Electrophoresis*, 16, 1090-1094
- Whitehead TP, Thorpe GHG, Carter TJN, Groucutt C, Kricka LJ, Enhanced luminescence procedure for sensitive determination of peroxidase-labeled conjugates in immunoassays, 1983, *Nature*, 305, 158-159
- Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphrey-Smith I, Hochstrasser DF, Williams KL, Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it, 1996, *Biotechnol Genet Eng Rev*, 13, 19-50
- Wilkins MR, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF (eds), *Proteome research: new frontiers in functional genomics*, 1997, Springer, Berlin Heidelberg New York
- Williams CS, Tsujii M, Reese J, Dey SK, DuBois RN, Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth, 2000, *J Clin Invest*, 105, 1589-1594

- Williams KL, Genomes and proteomes: towards a multidimensional view of biology, 1999, Electrophoresis, 20, 678-688
- Willoughby DA, Moore AR, Colville-Nash PR, COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease, 2000, Lancet, 355, 646-648
- Wu M, Xu L-G, Li X, Zhai Z, Shu H-B, AMID, an apoptosis-inducing factor-homologues mitochondrion-associated protein, induces caspase-independent apoptosis, 2002, J Biol Chem, 277, 25617-25623
- Wu W, Tang X, Hu W, Lotan R, Hong WK, Mao L, Identification and validation of metastasis-associated proteins in head and neck cancer cell lines by two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry, 2002, Clin Exp Metastasis, 19, 319-326
- Yaffe MB, Farr GW, Miklos D, Horwich AL, Sternlicht ML, Sternlicht H, TCP1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis, 1992, Nature, 358, 245-248
- Yamada K, Noguchi T, Nutrient and hormonal regulation of pyruvate kinase gene expression, 1999, Biochem J, 337, 1-11
- Yamamoto Y, Yin MJ, Lin KM, Gaynor RB, Sulindac inhibits activation of NF- κ B pathway, 1999, J Biol Chem, 274, 27307-27314
- Yan JX, Wait R, Berkelman T, Harry RA, Westbrook JA, Wheeler CH, Dunn MJ, A modified silver staining protocol for visualization of proteins that is compatible with matrix assisted laser desorption ionization and electrospray ionization mass spectrometry, 2000, Electrophoresis, 21, 3666-3672
- Yan SF, Fujita T, Lu J, Okada K, Shan Zou Y, Mackman N, Pinsky DJ, Stern DM, Egr-1, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress, 2000, Nat Med, 6, 1355-1361
- Yang SH, Nussenzweig A, Yang WH, Kim D, Li GC, Cloning and characterization of rat Ku70: involvement of Ku autoantigen in the heat-shock response, 1996, Radiat Res, 146, 603-611
- Yao R, Rioux N, Castonguay A, You M, Inhibition of COX-2 and induction of apoptosis : two determinants of nonsteroidal and anti-inflammatory drugs' chemopreventive efficacies in mouse lung tumorigenesis, 2000, Exp Lung Res, 26, 731-742
- Yates JR 3rd, Speicher S, Griffin PR, Hunkapiller T, Peptide mass maps: a highly informative approach to protein identification, 1993, Anal Biochem, 214, 397-408
- Ye Y, Meyer HH, Rapoport TA, Function of the p97-Ufd1-Npl4 complex in retrotranslocation from the ER to the cytosol: dual recognition of nonubiquitinated polypeptide segments and polyubiquitin chains, 2001, Nature, 414, 652-656
- Yeaman SJ, et al., Primary biliary cirrhosis : identification of two major M2 mitochondrial autoantigens, 1988, Lancet, 1, 1067-1070
- Yin MJ, Yamamoto Y, Gaynor RB, The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of I κ B kinase- β , 1998, Nature, 396, 77-80
- Yoo BC, Vikolinsky R, Engidawork E, Cairns N, Fountoulakis M, Lubec G, Differential expression of molecular chaperones in brain of patients with down syndrome, 2001, Electrophoresis, 22, 1233-1241

- Yoshio T, Masuyama JI, Minota S, Kaneko N, Iwamoto M, Okazaki H, Mimori A, Takeda A, Kano S, A close temporal relationship of liver disease to antiribosomal P0 protein antibodies and central nervous system disease in patients with systemic lupus erythematosus, 1998, *J Rheumatol*, 25, 681-688
- Zhang B, Chen JY, Chen DD, Wang, GB, Shen P, Tumor type M2 pyruvate kinase expression in gastric cancer, colorectal cancer and controls, 2004, *World J Gastroenterol*, 10, 1643-1646
- Zhang DH, Tai LK, Wong LL, Chiu LL, Sethi SK, Koay ES, Proteomics study reveals that proteins involved in metabolic and detoxification pathways are highly expressed in HER-2/neu positive breast cancer, 2005, *Mol Cell Proteomics*, 4, 1686-1696
- Zhang L, Yu Jian, Park BH, Kinzler KW, Vogelstein B, Role of BAX in the Apoptotic Response to Anticancer Agents, 2000, *Science*, 290, 989-992
- Zhou XM, Wong BCY, Fan XM, Zhang HB, Lin MCM, Kung HF, Fan DM, Lam SK, Non-steroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis in gastric cancer cells through up-regulation of bax and bak, 2001, *Carcinogenesis*, 22, 1393-1397
- Zhu L, et al., Inhibition of cell proliferation by p107, a relative of the retinoblastoma protein, 1993, *Genes Dev*, 7, 1111-1125
- Zimmermann KC, Waterhouse NJ, Goldstein JC, Schuler M, Green DR, 2000, *Neoplasia*, 2, 505-513

Tagungsbeiträge und Publikation

D. Fründ, R. M. Nüsing (2003)

NSAID-mediated protein expression in neuroblastoma cells.

44. Frühjahrstagung der DGPT gemeinsam mit der 20. Tagung der GUM, März 17 – 20, 2003

D. Fründ, R. M. Nüsing (2004)

Identification of apoptosis-modifying proteins in KELLY neuroblastoma cells.

9th Biennial Congress of the European Society for Developmental Perinatal & Paediatric Pharmacology (ESDP), June 16 – 20, 2004

D. Fründ, R. M. Nüsing

Flufenamic acid induced cell death of neuroblastoma cells.

Publikation in Vorbereitung

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Detlef Fründ
Geboren am	06.08.1973 in Bad Oeynhausen
Familienstand	verheiratet, 2 Kinder
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung

1980 – 1984	Grundschule, Bad Oeynhausen-Werste
1984 – 1993	Immanuel-Kant-Gymnasium, Bad Oeynhausen
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

1994 – 1998	Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg
1998 – 1999	Pharmaziepraktikum in der Apotheke des Universitätsklinikums Gießen und in der „Alten Apotheke“ in Neustadt, Hessen
1999	Approbation als Apotheker
2000 – 2006	Naturwissenschaftliche Promotion am Zentrum für Kinderheilkunde des Klinikums der Philipps-Universität Betreuung durch Prof. Dr. R. M. Nüsing Zentrum für Kinderheilkunde des Universitätsklinikums Marburg Prof. Dr. K. Kuschinsky Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Beruf

2000 – 2005	Apotheke des Universitätsklinikums Gießen
Seit 2005	Apotheke des Universitätsklinikums Gießen und Marburg

Danksagungen

Die vorliegende Arbeit entstand am Zentrum für Kinderheilkunde der Philipps-Universität Marburg auf Anregung und unter der Betreuung von Herrn Professor Dr. R. M. Nüsing.

Bei ihm möchte ich mich an dieser Stelle ganz herzlich für seine stete Bereitschaft zu konstruktiven Diskussionen, für seine Anleitung in verschiedene Analyse-Methoden, für die konstante Förderung und Unterstützung und nicht zuletzt für manches mutmachende Wort bedanken.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Professor K. Kuschinsky vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg für die Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten.

Danken möchte ich auch Frau PD Dr. S. Müller-Brüsselbach und Frau M. Alt vom Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung der Philipps-Universität Marburg für ihre hilfreiche Unterstützung bei den FACS-Analysen.

Allen Mitarbeitern und Kollegen aus dem Labor der Kinderklinik in Marburg danke ich für die gute Zusammenarbeit und die gegenseitige Unterstützung, die entscheidend zur angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen haben.

Ich danke meinen Eltern, weil sie mir das Studium der Pharmazie ermöglicht haben, wodurch die Grundlage für diese Arbeit geschaffen wurde.

Meinen Kindern Marie-Luise und Aaron danke ich dafür, dass sie mir nach so manchem langen Arbeitstag durch ihre Kindlichkeit und Arglosigkeit den Kopf wieder zurechtgerückt haben.

Wie ich meiner Anja danken soll, weiß ich kaum. Du hast mir während der gesamten Zeit durch Deine Liebe, Deine Gebete, Deine ermutigenden Worte und dadurch, dass Du so bist, wie Du bist, immer zur Seite gestanden. Dein Beitrag zu dieser Arbeit ist kaum in Worte zu fassen. Und noch schwieriger ist es, dafür Danke zu sagen, ohne hohl zu klingen.

Deswegen fühle Dich einfach umarmt!

Ich liebe Dich!